

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Contribución al estudio de la micoflora contaminante del
yogur**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana Isabel Mateos García

DIRECTOR:

Guillermo Suárez Fernández

Madrid, 2015

R: 162
v

TP
1784
084

Ana Isabel Mateos García



* 5 3 0 9 8 6 5 9 3 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x - 53 - 013464 - y

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA CONTAMINANTE DEL YOGUR

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1984



ARCHIVO



Colección Tesis Doctorales. Nº 84/84

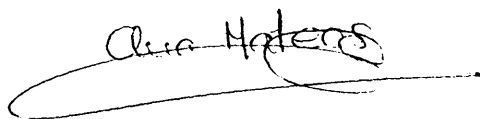
© Ana Isabel Mateos García
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-15389-1984



BIBLIOTECA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA
CONTAMINANTE DEL YOGUR

por ANA MATEOS GARCIA

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Ana Mateos', with a long, sweeping horizontal line underneath.

Memoria presentada en la Facultad
de Ciencias Biológicas de la Uni-
versidad Complutense de Madrid pa-
ra optar al grado de Doctor.

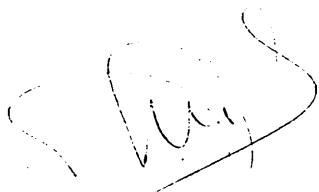
MADRID, 1982.

DON GUILLERMO SUAREZ FERNANDEZ, CATEDRATICO NUMERARIO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

C E R T I F I C O :

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA CONTAMINANTE DEL YOGUR", de la que es autora Dña. ANA MATEOS GARCIA, Licenciada en Biología, se ha realizado, en su totalidad, en los laboratorios del Departamento de Microbiología, en esta Facultad, bajo nuestra dirección y estimamos que reúne los requisitos necesarios para optar al título de Doctor, destacando su elevada densidad experimental y la contribución positiva del planteamiento propuesto tal y como se refleja en las conclusiones alcanzadas.

Y para que así conste a los efectos pertinentes firmo el presente certificado en Madrid a treinta de julio de mil novecientos ochenta y dos.



Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que con las ideas, los consejos y los medios que pusieron a mi disposición han hecho posible el llevar a término este trabajo. En primer lugar:

Al Profesor Sudrés Fernández, Catedrático de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, sin cuya dirección no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

Al Profesor Fernández Galiano, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado ser ponente de esta tesis.

A Don Ramón Alonso Sanz, cuya orientación y ayuda me resultaron de un valor incalculable.

A la Doctora Paya Vicens y a Doña María Teresa Cutuli de Simón, por su constante y desinteresada ayuda.

A las casas comerciales, que de una forma desinteresada nos han proporcionado las muestras objeto de estudio, facilitando de esta manera la realización del presente trabajo.

A todos mis compañeros, por los consejos y ayuda que en todo momento me prestaron.

A mis padres.

- I -

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
I. INTRODUCCION.	
I.1. YOGUR: DEFINICION Y CONCEPTO.....	1
I.1.1. Legislación vigente	2
I.1.2. Proceso de elaboración	11
I.2. ALIMENTO CONTAMINADO Y ALIMENTO NO CIVO	16
I.3. EL YOGUR COMO SUSTRATO PARA EL CRE CIMIENTO DE HONGOS	18
I.4. EL YOGUR COMO SUSTRATO PARA LA FOR MACION DE AFLATOXINAS	31
I.5. ANTECEDENTES HISTORICOS	45
II. OBJETO E INTERES	48
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ESQUEMA DEL TRA- BAJO	49
IV. MATERIAL Y METODOS	
IV.1. MATERIAL UTILIZADO	
IV.1.1. Material empleado para el estudio de la micoflora	52
IV.1.2. Material empleado en la investiga ción de las aflatoxinas	53

	<u>Pág.</u>
IV.1.2.1. Material empleado para el estudio de cepas toxicogénicas	53
IV.1.2.2. Material empleado en la producción artificial de aflatoxinas.	56
IV.2. MEDIOS DE CULTIVO	57
IV.2.1. Medios empleados en la recogida de muestras	57
IV.2.2. Medios de cultivo utilizados en los estudios taxonómico y toxicológico	59
IV.2.2.1. Medios empleados para el aislamiento e identificación de mohos a nivel de género	59
IV.2.2.2. Medios empleados en la identificación de mohos a nivel de especie	60
IV.2.2.3. Medios de identificación de levaduras	62
IV.2.2.3.1. Medios para el estudio de las características morfológicas ..	62
IV.2.2.3.2. Medios para determinar las características fisiológicas	63
IV.2.2.3.3. Medios para definir las características de reproducción	67
IV.2.2.4. Medios para inducir la producción de aflatoxinas	69
IV.2.3. Soluciones y colorantes	69
IV.3. METODOS DE ESTUDIO	
IV.3.1. Método de recogida de muestras.	71
IV.3.2. Método de recuento y aislamiento de colonias	71

- III -

	<u>Pág.</u>
IV.3.3. Métodos de identificación	73
IV.3.3.1. Métodos de identificación de mohos a nivel de género	73
IV.3.3.2. Métodos de identificación de mohos a nivel de especie	74
IV.3.3.3. Método de identificación de levaduras	75
IV.3.4. Métodos de conservación de cultivos puros	79
IV.3.5. Métodos para la determinación de aflatoxinas	79
IV.3.5.1. Método para la determinación de aflatoxinas producidas por las posibles cepas toxicogénicas en trigo humedecido	79
IV.3.5.2. Método para la determinación de aflatoxinas en el yogur producidas por cepas toxicogénicas	85
IV.3.6. Métodos estadísticos	87
IV.3.6.1. Estudio de la significación de la diferencia del crecimiento en las situaciones inicial y final: prueba del χ^2	87
IV.3.6.2. Análisis de componentes principales	89

V. RESULTADOS

V.1. MICROFLORA DEL YOGUR	
V.1.1. Relación de géneros encontrados en nuestro estudio	91

- IV -

	<u>Pág.</u>
V.1.2. Taxonomía aplicada	93
V.2. ESTUDIO ECOLOGICO DE LA POBLACION FUNGICA.	
V.2.1. Porcentajes de aparición	172
V.2.2. Recuento de unidades formadoras de colonias	198
V.2.3. Estudio de los medios de cultivo	247
V.2.4. Estudio de frecuencias de los 4 géneros predominantes dependiendo del medio de cultivo...	252
V.2.5. Prueba del χ^2	269
V.2.6. Estudio de los componentes principales	293
V.3. ESTUDIO AFLATOXICOGENICO	
V.3.1. Comprobación de cepas aflatoxicogénicas	296
V.3.2. Inoculación en el yogur de cepas aisladas y de colección productoras de aflatoxinas	296

VI. DISCUSION

VI.1. DISCUSION DEL ESTUDIO DE LA MICROFLORA DEL YOGUR	
VI.1.1. Medios de cultivo	298
VI.1.2. Recuento de colonias	300
VI.1.3. Microflora del yogur	302
VI.2. TRATAMIENTO DE DATOS	304
VI.3. DISCUSION DEL ESTUDIO AFLATOXICOGENICO	

	<u>Pág.</u>
VI.3.1. Estudio de cepas aflattoxigénicas	306
VI.3.2. Inoculación de cepas aflatoxicogénicas en el yogur	307
VII. CONCLUSIONES	309
VIII. RESUMEN	312
IX. REVISION BIBLIOGRAFICA	318

I. INTRODUCCIÓN

I.1. YOGUR: DEFINICION Y CONCEPTO

Entre los productos derivados de la leche que son utilizados como alimento del hombre e incluidos en la clasificación - que de ellos hace el vigente Código Alimentario Español, podemos citar las leches fermentadas o acidificadas y concretamente cabe destacar el "yogur o yoghourt" que es definido por la Norma sobre yogur en el Real Decreto de 5 de Marzo de 1976 como:

"El producto de leche coagulada obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada, nata pasteurizada, leche concentrada, lecha parcial o totalmente desnatada pasteurizada, con o sin adición de leche en polvo, entera o desnatada"

Dicha Norma hace constar que los microorganismos responsables de esta fermentación láctica, deben encontrarse viables y en cantidad abundante en el producto terminado para que no varíen sus características propias.

Este texto legal, que regula las características esenciales sobre el yogur, establece una clasificación sobre los distintos tipos del mismo y que es:

1. Yogur azucarado: es al que se han añadido solamente alguno o algunos de los azúcares comestibles.
2. Yogur edulcorado: es al que se han añadido solamente edulcorantes autorizados por la Dirección General de la Salud Pública.
3. Yogur con frutas, zumos y otros productos naturales: a los que se han añadido los ingredientes citados, junto con agentes aromáticos y aditivos autorizados.

4. Yogur aromatizado: es al que se han añadido agentes aromáticos y aditivos autorizados.

1.1.1. LEGISLACION VIGENTE

Es objeto de la Norma, definir las condiciones y características que deben reunir los productos para su adecuada comercialización en el mercado nacional.

Como se describió en el apartado anterior la presente Norma se aplica al yogur, yogur azucarado, yogur edulcorado, yogur con frutas, zumos y otros productos naturales y yogur aromatizado.

Las definiciones de dichos productos, han sido citadas anteriormente, por lo que consideramos innecesaria su repetición.

1.1.1.1. Higiene

El tratamiento de las materias primas, adiciones esenciales, - adiciones facultativas y aditivos, la fabricación, manipulación, conservación y comercialización del producto se harán de modo que quede perfectamente garantizado el cumplimiento de las disposiciones sanitarias y la higiene del producto.

El yogur, desde el momento de su fabricación hasta la adquisición por el consumidor, se mantendrá a temperaturas comprendidas entre uno y diez grados centígrados.

Es evidente que el quebrantamiento de esta norma puede tener importantes implicaciones de carácter sanitario.

1.1.1.2. Envasado

Los diversos tipos de yogures se presentarán al consumidor debidamente envasados en recipientes cerrados.

I.1.1.2.1. Material de envases: vidrio, cartón parafinado, porcelanas, material macromolecular o cualquier otro material autorizado por la Dirección General de Sanidad

I.1.1.2.2. Contenido: los envases tendrán un contenido neto mínimo de 125 gramos.

I.1.1.3. Etiquetado y rotulación

De acuerdo con lo establecido en el Decreto 336/1975, de 7 de marzo, por el que se aprueba la Norma General para rotulación, etiquetado y publicidad de los alimentos envasados y embalados, se aplicarán las especificaciones que seguidamente se señalan:

El yogur dispuesto para el consumo llevará en el cuerpo del envase o en su cierre, con caracteres visibles e indelebles, en idioma español, las siguientes indicaciones:

I.1.1.3.1. Denominación del producto

I.1.1.3.1.1. El yogur que contenga 2'0 por 100 o mas de materia grasa, deberá denominarse "yogur o yoghourt".

I.1.1.3.1.2. El yogur que contenga 0'5 por 100 o menos de materia grasa deberá denominarse "yogur desnatado" o "yoghourt desnatado".

I.1.1.3.1.3. Las denominaciones que figuran en los dos apartados anteriores se aplicarán también al yogur al que se han añadido azúcares o edulcorantes, con la condición de que tales denominaciones vayan acompañadas del calificativo azucarado o la expresión "con azúcar" o "edulcorado" respectivamente.

I.1.1.3.1.4. El yogur definido con frutas, zumos y/u otros productos naturales deberá denominarse "yogur con ..." ó "yoghourt con ...", siempre que lleve incorporados fragmentos o can-

tidades ostensibles del ingrediente que le proporciona el calificativo. En lugar de los puntos suspensivos, se pondría el nombre de la(s) fruta(s) o alimento(s) del citado ingrediente.

I.1.1.3.1.5. El yogur definido aromatizado deberá denominarse "yogur sabor ..." ó "yoghourt sabor ...". En lugar de los puntos suspensivos se pondrá el nombre de la fruta o alimento al que corresponde el agente aromático utilizado.

I.1.1.3.2. Relación de ingredientes y aditivos

Deberán relacionarse en el envase, individualmente o haciendo referencia al grupo a que pertenecen (leche, azúcares, frutas, zumos, colorantes, espesantes, conservadores y agentes aromáticos) y por orden decreciente de proporciones.

En el caso de utilización de otros derivados lácteos, distintos de la leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada, deberá hacerse mención de los mismos en la relación de ingredientes.

En los yogures edulcorados deberán figurar los nombres específicos de los edulcorantes utilizados.

I.1.1.3.3. Contenido neto

El contenido se expresará en peso neto, admitiéndose una tolerancia de conformidad con el sistema.

I.1.1.3.4. Marca registrada o nombre o razón social y domicilio o sigla identificadora del fabricante o importador en su caso.

I.1.1.3.5. Fecha de caducidad (día y mes) con un límite de - veinte días como máximo, contados a partir del día en que el producto fue envasado para su venta definitiva.

I.1.1.3.6. La expresión "Consérvese frío"

I.1.1.3.7. País de origen, en el caso de ser importado

I.1.1.3.8. Número de Registro Sanitario de la industria

I.1.1.4. Factores esenciales de composición y calidad

I.1.1.4.1. Yogur.

Contenido mínimo de materia grasa de
leche 2'0% m/m

Extracto seco magro, mínimo 8'5% m/m

I.1.1.4.2. Yogur desnatado.

Contenido máximo de materia grasa de
leche 0'5% m/m

Extracto seco magro, mínimo 8'5% m/m

I.1.1.4.3. Yogur azucarado.

Cumplirá los requisitos especificados en los apartados anteriores en cuanto se refiere a la parte de leche que entra en su composición.

I.1.1.4.4. Yogur edulcorado

Cumplirá los requisitos especificados en los dos primeros apartados en cuanto se refiere a la parte de leche que entra en su composición.

I.1.1.4.5. Yogur con frutas, zumos y/u otros productos naturales.

Cumplirá los requisitos especificados en I.1.1.4.1. y I.1.1.4.2. en cuanto se refiere a la parte de leche que entra en su composición.

La cantidad mínima de yogur en el producto terminado será del 70% m/m.

I.1.1.4.6. Yogur aromatizado

Cumplirá los requisitos especificados en los dos primeros apartados en cuanto se refiere a la parte de leche que entra en su composición. La cantidad mínima de yogur en el producto terminado será del 80% m/m.

I.1.1.5. Materias primas y adiciones esenciales y facultativas

I.1.1.5.1. Materias primas esenciales

Leche pasteurizada, leche concentrada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada, leche concentrada total o parcialmente desnatada, nata pasteurizada y mezcla de dos o mas de estos productos.

I.1.1.5.2. Adiciones esenciales

Cultivos de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

I.1.1.5.3. Adiciones facultativas

- Leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada en cantidad de hasta el 5 por 100, como máximo, en el yogur natural y de hasta el 10 por 100, como máximo, en los otros tipos de yogur.

- Suero en polvo, proteína de leche y/o de suero, de origen vacuno.

- Azúcares en los yogures definidos.

- Ingredientes naturales, tales como frutas y hortalizas (frescas, congeladas, en conserva, liofilizadas o en polvo), puré de

frutas, pulpa de frutas, compota, mermelada, confitura, jarabes, zumos, miel, chocolate, cacao, café, especias y otros ingredientes naturales aromatizantes inocuos, solamente en los yogures - definidos como yogur con frutas, zumos y/u otros productos naturales y yogur aromatizado.

I.1.1.6. Aditivos

Sólo podrán emplearse aditivos autorizados por la Dirección General de Sanidad en los yogures definidos como yogur edulcorado, yogur con frutas, zumos y/u otros productos naturales y yogures aromatizados.

I.1.1.6.1. Edulcorantes autorizados solamente en los yogures edulcorados.

I.1.1.6.2. Sustancias aromatizantes naturales y/o idénticas a las naturales definidas en el Decreto 406/1975, de 7 de Marzo, en los yogures de frutas, zumos y/u otros productos naturales, así como en los aromatizados y edulcorados.

I.1.1.6.3. Colorantes, estabilizadores y conservadores autorizados expresamente para este fin por la Dirección General de Sanidad.

I.1.1.7. Métodos de análisis

En tanto no se establezcan normas españolas para la determinación de las especificaciones de esta Norma, se utilizarán los siguientes métodos:

I.1.1.7.1. Preparación de la muestra: Norma Chimie Ministerio de Agricultura Francés XIV-I.

I.1.1.7.2. Determinación de materia grasa: Idem XIV-3.

I.1.1.7.3. Determinación de extracto seco: Idem XIV-2.

I.1.1.7.4. Identificación de colorantes, edulcorantes, espesantes y conservadores: Métodos seleccionados y recomendados por el Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.

I.1.1.7.5. Análisis microbiológico

- Recuento de coliformes.
- *Escherichia coli*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Streptococcus faecalis* (grupo D de Lancefield).
- Gérmenes sulfito-reductores (*C. perfringens*).
- Hongos.
- Exámen al microscopio.

(Métodos seleccionados y recomendados por el Centro Nacional de Alimentación y Nutrición).

I.1.1.8. Sistema de determinación del contenido neto

El contenido se expresará en peso neto, admitiéndose una tolerancia de hasta 10,3 por 100 de "m" (siendo "m" la cantidad nominal del contenido señalado en el envase expresado en gramos) en el contenido conjunto de una muestra, obtenido de tal forma que sea lo mas representativo posible y que obligatoriamente estará constituida por diez elementos intactos y debidamente cerrados, para todos los tipos de yogur.

En el caso concreto del definido "yogur con frutas, zumos y/u otros productos naturales", la tolerancia a que se ha hecho referencia podrá alcanzar hasta 11,5 de "m".

I.1.1.9. Aditivos autorizados para la elaboración del yogur

En base a lo establecido en el punto 2 del art. 2º del Decreto 2519/1974, de 9 de Agosto, sobre entrada en vigor, aplicación y -

desarrollo del Código Alimentario Español, la Dirección General de Sanidad, hoy Dirección General de la Salud Pública, es el organismo responsable de todo lo que afecte a los aditivos, en relación con cada grupo de alimentos o productos o para casos concretos y determinados.

Por tal motivo y como complemento de la Norma sobre yogur (yoghourt), yogur azucarado, yogur edulcorado, yogur con frutas, con zumos o con otros productos naturales y yogur aromatizado, aprobado por Decreto 705/1976, de 5 de Marzo, quedan autorizados los siguientes aditivos:

- Colorantes

- . Amaranto (12 p p m)
- . Azorrubina.
- . Beta-Apo 8 carotenal.
- . Esteres metílico y etílico del ácido Beta-Apo 8 carotenoico.
- . Beta caroteno.
- . Bija o Annato.
- . Clorofilas.
- . Eritrosina (27 p p m).
- . Indigotina (6 p p m).
- . Ponceau 4R (48 p p m).
- . Amarillo de quinoleina.
- . Riboflavina.
- . Amarillo Sol FCF o amarillo ocaso (12 p p m).
- . Tartracina (18 p p m).
- . Curcumina.
- . Caramelo (150 p p m).
- . Cochinilla o ácido carmínico (20 p p m).
- . Rojo remolacha o Betanina (250 p p m).
- . Pardo chocolate FB (30 p p m).
- . Xantofilas.

Los colorantes que no llevan dosis específicas se emplearán a

concentraciones máximas de 100 p p m sobre producto final, bien sólidos o combinados.

- Edulcorantes

- . Sorbitol.
- . Xilitol.
- . Sacarina y su sal sódica y cálcica.
- . Ciclamato y su sal sódica y cálcica.

- Estabilizadores

- . Furcelaran
- . Goma xantan.
- . Goma arábica.
- . Goma guar.
- . Goma garrofin.
- . Goma tragacanto.
- . Agar.
- . Alginato sódico, potásico, cálcico y amónico.
- . Alginato de propilenglicol.
- . Pectina.
- . Gelatina.
- . Almidones comestibles y modificados.

3 gramos/Kg

- Conservadores

- . Acido sórbico y sus sales, sódica, potásica y cálcica

600 p p m

Solos o combinados

- . Acido benzoico y sus sales
- . Anhídrido sulfuroso

120 p p m }
50 p p m } (1)

(1) Como consecuencia de los fenómenos de transferencia.

I.1.2. PROCESO DE ELABORACION

Antes de profundizar en el proceso de fabricación propiamente dicho, vamos a hacer referencia a algunos de los factores mas importantes que influyen en la producción industrial del yogur:

— Consistencia y sabor

Las características mas esenciales del yogur son la consistencia del producto, comprendiendo el concepto consistencia/viscosidad, y el sabor. El gel debe ser muy firme y no debe presentar grumos ni granos. Debe tener una apariencia lisa y brillante, con un sabor fresco, ácido y aromático. El pH debe ser entre 4,0 y 4,5.

— Estandarización

El contenido en materia grasa en la fabricación del yogur puede estandarizarse entre 0,5 y 4%.

El aumento de extracto seco total, especialmente el contenido en caseína, da a los productos lácteos fermentados mas firmeza, disminuyendo la tendencia a la sinéresis (separación del suero).

— Homogeneización

La homogeneización mejora la conservabilidad y la consistencia de los productos fermentados. La firmeza del gel aumenta en razón directa de la presión del homogeneizador, en tanto que la leche sea homogeneizada en su totalidad. La leche destinada a la fabricación de yogur debe homogeneizarse a una presión de 200 bar. y a una temperatura de 55-70° c.

La homogeneización mejora la cohesión estructural, pero también confiere un sabor más acentuado impidiendo la separación de la crema.

— Tratamiento térmico

Los profesionales están casi siempre de acuerdo en que el tratamiento térmico de la leche realza la calidad de las leches fermentadas en los siguientes aspectos:

- . Mejora las propiedades de la leche como medio de cultivo para las bacterias lácticas.
- . El coágulo es mas firme.
- . Se obtiene una viscosidad uniforme.
- . Se disminuye la tendencia a la sinéresis del producto terminado.

Los ensayos experimentales así como la práctica han demostrado que las condiciones óptimas del yogur se obtienen con un tratamiento térmico de 90-95º C y una retención de 3 a 5 minutos en cambiadores de calor de placas con tubos de retención adecuados.

— Preparación del cultivo

La flora normal del yogur está constituida por el *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* que se desarrollan normalmente bajo los efectos de una acción simbiótica.

El *L. bulgaricus* es un bacilo que contiene a veces corpúsculos de volutina que acidifica a la leche a un pH medio de 3,8 (unos 150º D), en casos extremos su poder de acidificación alcanza un pH de 3,2.

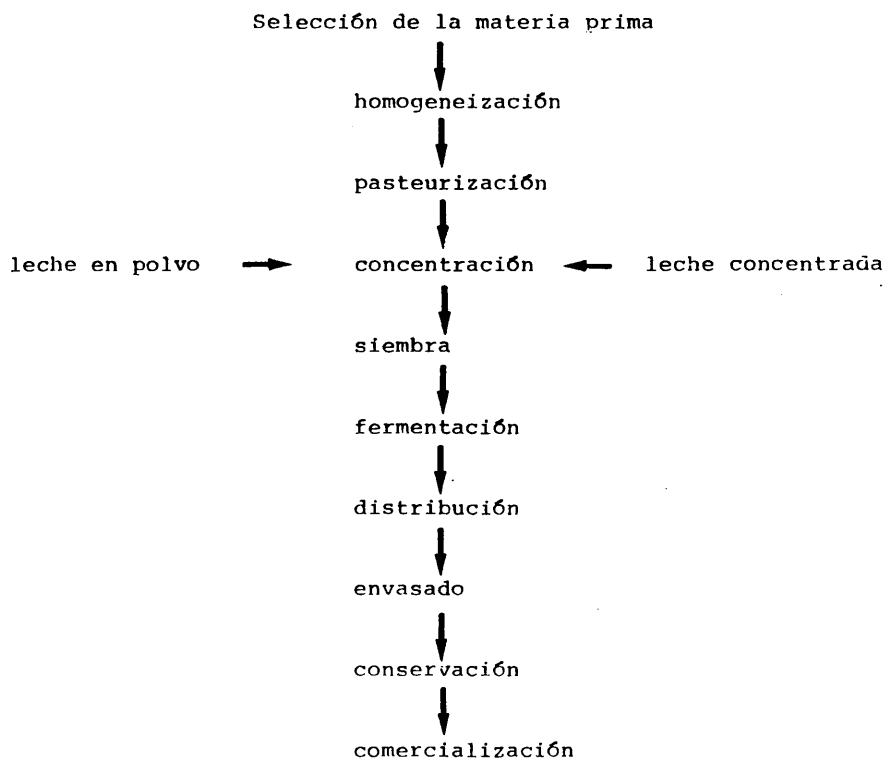
El *Str. thermophilus* como su nombre indica, se desarrolla a elevadas temperaturas. Su poder de acidificación es menor que el del *L. bulgaricus*, de la lactosa llega a formar hasta el 1 por 100 de ácido láctico.

En la práctica se ha comprobado que los citados microorganismos deben encontrarse en partes iguales para obtener un buen yogur.

Un buen fermento de yogur no debe contener - ninguna otra bacteria que pueda ocasionar trastornos en la fermentación.

La posible acción de bacteriófagos es siempre una amenaza en un cultivo contaminado por estos virus, la producción de ácido es lenta y la formación de cuajada débil.

Una vez vistos algunos de los factores que se consideran como imprescindibles para una buena producción, pasamos a describir el sistema de fabricación del yogur, comenzando - con un breve esquema que nos dará idea de todo el proceso de elaboración:



La selección de la materia prima es altamente importante ya que es necesario una leche con alto contenido en proteínas por razón de su elevada densidad, y así mismo es indispensable evitar la presencia de sustancias inhibidoras de los gérmenes responsables de la fermentación de la leche que nos va a dar como producto final el yogur.

La homogeneización se realiza con objeto de mejorar el sabor e impedir la separación de la grasa. Este proceso - reduce el tamaño de los glóbulos grasos, pero aumenta el volumen de las partículas de caseína, con lo cual se forma el coágulo blando; para evitar esto, se realiza la homogeneización parcial consiguiendo así no variar la estructura de las proteínas.

Para la pasteurización, las temperaturas necesarias mínimas son de 85º y hasta de 100º C; esto es debido a que la albúmina y la globulina floculan a las temperaturas mayores - de 75º C, y sin embargo la caseína no se coagula a esos niveles.

La concentración se va a realizar según la densidad elegida, y ésta podemos obtenerla de dos maneras:

- Concentración de la leche por sustracción de agua.
- Adición de leche en polvo o condensada; aquí debe tenerse la precaución de pasteurizar antes de añadir el cultivo iniciador de la fermentación.

A continuación se va a realizar el proceso de - siembra, en el cual la leche se enfría a 1-2º sobre la temperatura de incubación y se siembra con cultivo en la proporción del 2 al 3%.

Una vez realizada la etapa anterior, se produci-

r  la fermentación en los tanques durante un tiempo de 2 horas - 30 minutos aproximadamente. De estos tanques pasa el producto por conductos cerrados hasta la máquina de distribución, lo que hace que la posibilidad de contaminación sea casi nula, por realizarse todo el proceso en circuito cerrado.

Penetrando ya en la fase de distribución y envasado, lo primero que hay que tener en cuenta es que el envase que vamos a utilizar está en buenas condiciones de asepsia para a continuación realizar el llenado de los envases.

En este proceso es en el que hay mayor posibilidad de contaminación, pues este paso deberá realizarse en cámaras totalmente asépticas, condición ésta que actualmente en España no se cumple en todas las factorías productoras de yogur.

Posteriormente se procede al tapado de los envases, conservación y comercialización.

I.2. ALIMENTO CONTAMINADO Y ALIMENTO NOCIVO: DEFINICION

Según el Código Alimentario Español cuyo texto se aprobó por el Decreto 2484/1967, de 21 de setiembre, se define:

ALIMENTO CONTAMINADO

" Tendrá consideración de contaminado todo alimento que -
" contenga gérmenes patógenos, sustancias químicas o ra--
" dioactivas, toxinas o parásitos capaces de producir o
" transferir enfermedades al hombre o a los animales.-

" No será obstáculo a tal consideración, la circunstancia
" de que la ingestión de tales alimentos no provoque tras
" tornos en quienes los hubieran consumido."

ALIMENTO NOCIVO

" Tendrá la consideración de alimento nocivo todo aquél -
" que:

" a) Cuando utilizado con criterio de normal prudencia y
" conforme a las prescripciones de su preparación y em-
" pleo o en cualquiera de las formas que se ajustan a
" prácticas de elemental previsión produzcan efectos per-
" judiciales en el consumidor.-

" b) Cuando aún no siendo perjudiciales a su inmediato -
" consumo, se puede prever que su ingestión repetida en-
" traña peligro para la salud sin que ello obedezca a su
" uso inmoderado o inoportuno o a un consumo irreflexivo
" del mismo.-

" Cuando aún no siendo nocivos para el consumidor medio -
" lo es o puede serlo para un grupo determinado de consu-

- 17 -

" midores (lactantes, embarazadas, diabéticos ...) al que
" van especialmente destinados."

Evidentemente el yogur, en determinadas circunstancias puede resultar no solamente un producto contaminado sino un alimento - nocivo, encerrando un especial peligro su consumo, para personas enfermas, niños y ancianos.

I.3. EL YOGUR COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE HONGOS

El crecimiento y desarrollo de los microorganismos que intervienen en la fermentación que conduce a la elaboración del yogur depende, de una parte, de los caracteres del propio agente microbiano y de otra de las que suministra el sustrato fermentable.

Ambos factores son muy importantes en nuestro estudio y exigen una consideración previa, pero de una manera principal debemos referirnos a los caracteres de la microflora contaminante.

El yogur es una leche fermentada resultante de la acción que sobre ella producen el *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* modificando los componentes normales de la leche. La lactosa se transforma parcialmente en ácido láctico y los prótidos sufren un comienzo de peptonización que mejora su digestibilidad.

Básicamente su composición es:

Materia grasa	2%
Solidos totales	10,98%
Proteínas totales	3,45%
Carbohidratos	5,15%
Cenizas	0,75%

Algunas de sus principales características son:

Un pH ácido, que puede estar comprendido entre 3,5 y 4,5.
Su temperatura de incubación es alrededor de 45° C, temperatura en la que la leche cuajada alcanza su mayor grado de acidez.

La temperatura de almacenamiento es de 1-5° C.

Goodenough y Kley, citados por Jap (1978) hallaron únicamente

trazas de glucosa a lo largo de la fermentación del yogur, mientras que la galactosa aumentaba desde una concentración inicial de trazas hasta 1,6%. Las muestras de yogures comerciales presentan solamente trazas de glucosa, mientras que la galactosa varía entre límites de 1,5 a 2,5%.

Dado que el yogur es una leche fermentada se considera un alimento inestable, puesto que incluso a baja temperatura, los gérmenes que contiene pueden desarrollarse o producir cambios bioquímicos.

Por esta razón se estabilizan los productos fermentados mediante un tratamiento térmico capaz de destruir totalmente, o en parte, su población microbiana.

Con respecto a este punto existen actualmente dos teorías sostenidas por diversos autores y que son reflejadas por Veisseyre (1980):

a) La presencia de un número determinado de microorganismos en el yogur, puede contribuir a la defensa del organismo contra algunos gérmenes indeseables o a la aparición de reacciones inmunitarias no específicas.

b) Otros autores consideran que el interés nutritivo de las leches fermentadas y principalmente del yogur reside en la actividad metabólica de los gérmenes en el momento de la preparación del producto: hidrólisis de las proteínas, degradación de la lactosa, elaboración de compuestos diversos fácilmente asimilables por el organismo humano.

Estos microorganismos, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* tienen las siguientes propiedades:

Lactobacillus bulgaricus es una bacteria láctica homofermenta

tiva que se desarrolla optimamente entre 45 y 50º C, acidificando fuertemente el medio. Puede formar hasta un 2,7% de ácido láctico en la leche.

Streptococcus thermophilus se reproduce bien entre 37 y 40º C pero también se desarrolla a 50º C. Es una especie homofermentativa termorresistente que sobrevive a un calentamiento a 65º C durante 30 minutos, puede ser destruída por un fago termorresistente.

Ambos gérmenes son microaerofilos y soportan muy bien los medios ácidos (pH de 4 a 4,5). En el yogur conviven en estrecha simbiosis y cuando se cultivan conjuntamente, producen mas ácido láctico que cuando crecen aislados.

Lactobacillus bulgaricus favorece el desarrollo de *Streptococcus thermophilus*. El lactobacilo proteolítico, obtiene ciertos aminoácidos de la caseína, los cuales activan el desarrollo de los streptococos. La valina es uno de los importantes.

Al comienzo de la preparación, el pH de la leche es favorable a los streptococos y éstos predominan y ponen en marcha la fermentación láctica. La acción caseolítica de los lactobacillus estimula el desarrollo de los streptococos. Al prolongar la acidificación, el pH de la leche se vuelve poco favorable para los streptococos, que progresivamente son reemplazados por los lactobacillus.

En 1968, se demostró que *Str. thermophilus* también estimula el crecimiento del lactobacilo produciendo un metabolito que puede ser reemplazado por el ácido fórmico. Este efecto sólo puede evidenciarse en la leche sometida a un calentamiento moderado, pues un calentamiento pronunciado provoca la formación de ácido fórmico a partir de la lactosa.

Los microorganismos del yogur participan en la viscosidad - que presenta el yogur tras el batido. Según las cepas utilizadas las cantidades de mucus elaboradas por *L. bulgaricus* son muy variables.

Pasamos ahora a estudiar las características principales de los hongos, como agentes contaminantes, en torno a los que gira el interés de nuestro estudio.

Los hongos son microorganismos eucarióticos, quimiorganotróficos, unicelulares (levaduras) o pluricelulares (mohos) que se caracterizan por poseer paredes rígidas que contienen celulosa ó quitina o ambas presentan reproducción sexual y asexual.

Von Arx (1981) por razones prácticas establece una clasificación de todos los hongos y organismos semejantes a ellos en un reino polifilético.

La clasificación es la siguiente:

REINO MYCOTA

phylum: Myxomycetes

Acrasiomycetes

Plasmodiophoromycetes

Labrynthulomycetes

phylum: Oomycota

clases: Oomycetes

Hyphochytridiomycetes

phylum: Chytridiomycota

clases: Chytridiomycetes

phylum: Eumycota

clases: Zygomycetes

Endomycetes

Ascomycetes

Basidiomycetes
Deuteromycetes.

Ya que en el phylum Eumycota se encuentran los hongos verdaderos y al ser éstos el objeto de nuestro estudio, podemos resumir sus características esenciales en:

- . Seres eucarióticos, es decir, tienen el núcleo separado del citoplasma por una membrana nuclear.
- . El soma puede estar constituido por una célula en el caso - de las levaduras o por un micelio mas o menos complejo en los mohos.
- . Están provistos de pared celular con quitina y otros polisacáridos.
- . Presentan tanto reproducción sexual como asexual.
- . Metabólicamente difieren de las algas por carecer de clorofila, son heterótrofos y la mayor parte aerobios estrictos.

Características y descripción de las diferentes clases

CLASE ZYGOMYCETES

El nombre de zygomycetes viene dado por la capacidad de producir una espora de resistencia de origen sexual llamada zygospora.

La zygospora resulta de la fusión completa de gametangios. Su formación es el caracter principal de los representantes de esta clase, sin embargo se incluyen dentro de ella especies en las que no conociéndose la forma sexual de reproducción, presentan otros caracteres que justifican tal posición. Entre nuestros caracteres se destacan principalmente la producción de esporangios, conidios característicos y la ausencia de células móviles.

La mayoría de los micólogos consideran a esta clase como grupo natural ya que en su definición entran caracteres ecológicos, fisiológicos y biológicos.

Por tanto, las dos características principales de los zygomycetes son:

- Reproducción sexual, la realizan por medio de copulación gametágica, que da como resultado la formación de una zygospora.
- Reproducción asexual, tiene lugar por medio de esporas no móviles.

CLASE ENDOMYCETES

En esta clase están incluidas las levaduras y hongos levaduriformes, además de algunos hongos parásitos incluidos hasta ahora en Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes.

No tienen cuerpos fructíferos o himenios. El micelio está ausente o reducido. Producen blastoporas o artrosporas.

CLASE ASCOMYCETES

Los caracteres generales de la clase son:

- Su micelio es septado.
- No presentan células flageladas.
- Forman un cuerpo fructífero sobre el cual se forman los ascos.
- El asco es el carácter principal, siendo una estructura en forma de saco que contiene una cantidad generalmente determinada de ascosporas, las cuales se producen como resultado de un proceso de cariogamia y meiosis. Típicamente se forman ocho ascosporas por asco, pudiendo variar este número, según la especie de uno hasta mas de mil.

La producción de ascos es el carácter mas importante de la clase, como ya se ha dicho, de tal forma que si un hongo produce sus esporas dentro de ascos, lo podemos incluir dentro de esta

clase, sin considerar ningún otro carácter, sin embargo en caso contrario no puede ser colocado con propiedad dentro de ella. -

Los Ascomycetes en general, tienen dos fases reproductoras - distintas, el estado sexual, a menudo llamado estado ascigeno ó perfecto y el estado conidial o asexual, a menudo designado como estado imperfecto.

Dado que muchos Ascomycetes, particularmente los parásitos, forman asocarpos una vez al año, lo normal es encontrarlos en su estado conidial, y como ya se ha dicho que el carácter taxonómico definitivo en esta clase es el estado ascal, nos encontramos con esta dificultad a la hora de su identificación. Dificultad que se resuelve incluyendo a estos hongos dentro de los Deuteromycetes. De esta forma podemos identificar un moho en su estado conidial sin necesidad de conocer su estado ascal. Constituyendo así una clase forma, Deuteromycetes y dentro de ella tendremos - los distintos géneros forma.

CLASE BASIDIOMYCETES

Es la clase mas evolucionada. Son los hongos llamados superiores.

Se diferencian de los demás hongos en que producen sus esporas, llamadas basidiosporas en la parte externa de una estructura productora de esporas, el basidio.

Las basidiosporas son generalmente unicelulares y haploides. En cada basidio se produce un número determinado de basidiosporas generalmente cuatro.

El micelio está formado por hifas tabicadas bien desarrolladas que penetran en el sustrato. En algunas formas, las hifas se disponen paralelamente y se reúnen para formar gruesos cordones

de micelio, denominados rizomorfos.

El micelio de la mayoría de los Basidiomycetes pasa por tres estadios distintos de desarrollo, primario, secundario y terciario para que el hongo complete su ciclo de vida.

CLASE DEUTEROMYCETES O FUNGI IMPERFECTI

Dentro de este grupo, incluimos a los hongos que por su estructura general y reproducción asexual se parecen a los Ascomycetes o a los Basidiomycetes, pero en los que no ha sido observado su estado sexual. A esta clase forma se la conoce como *Fungi Imperfecti*.

Los estados conidiales de la mayoría de los hongos de este grupo, son similares a los estados conidiales de algunos Ascomycetes bien conocidos, lo cual hace suponer que con pocas excepciones, los hongos imperfectos representan estados conidiales de Ascomycetes cuyos estados ascígenos se forman tan raramente en la naturaleza que no han sido encontrados, o bien en la evolución de estos organismos, han desaparecido de su ciclo biológico.

En unos pocos casos, los estados perfectos que se han descubierto pertenecen a Basidiomycetes.

Por tanto podemos considerar a los Fungi Imperfecti, como estados conidiales de Ascomycetes o mas raramente de Basidiomycetes, cuyos estadios sexuales no se han descubierto o bien ya no existen, por pérdida evolutiva en su ciclo biológico.

Pasamos ahora a hacer un estudio de las principales características de los hongos que constituyen esta clase forma.

Caracteres generales

Son un grupo de organismos vivos desprovistos de clorofila.

Tienen por lo general paredes celulares bien definidas, son generalmente inmóviles, aunque pueden tener células reproductoras móviles y se reproducen por medio de esporas. Son por lo general filamentosas y multicelulares.

Los filamentos que constituyen el cuerpo de un hongo se alargan por crecimiento apical, pero la mayor parte del organismo es potencialmente capaz de crecimiento y un pequeño fragmento de cualquier parte del hongo es suficiente para comenzar un nuevo individuo.

Nutrición y crecimiento

Obtienen su alimento como parásitos, pudiendo vivir sobre sustancias orgánicas muertas. La mayoría de los hongos conocidos, parásitos o no, son capaces de vivir sobre materia orgánica muerta, como lo demuestra el hecho de poder cultivarlos artificialmente sobre medios sintéticos.

Los hongos se diferencian de la mayoría de las plantas verdes por requerir alimento ya elaborado, pues son incapaces de sintetizarselo ellos mismos. Pero cuando disponen de carbohidratos en cualquier forma, preferiblemente glucosa, sacarosa o maltosa, la mayoría de los hongos puede sintetizar sus propias proteínas, utilizando fuentes inorgánicas de nitrógeno y diversos elementos minerales esenciales para su crecimiento. Los estudios de laboratorio han establecido que el C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Fe, Fe y Zn son necesarios para muchos mohos. Como regla general, la glucosa es la mejor fuente de N, siguiéndole los compuestos amoniacales y los nitratos.

La mayoría de los hongos crecen entre 0° y 35° C, pero las temperaturas óptimas están entre 20° y 30° C. Se ha demostrado la capacidad de algunos hongos para soportar, por lo menos durante unas pocas horas, temperaturas extremadamente bajas (-195°C).

En contraste con las bacterias, los hongos prefieren un medio ácido para su crecimiento, siendo el óptimo alrededor del pH 6.

Aunque la luz no es necesaria para el crecimiento de los hongos, resulta esencial para la esporulación de muchas especies.

La luz también desempeña un papel en la dispersión de las esporas, ya que en muchos hongos los órganos portadores son positivamente fototrópicos y descargan sus esporas hacia la luz.

Estructuras somáticas

El talo de los Fungi Imperfecti está constituido por hifas - bien desarrolladas, tabicadas y ramificadas. Las células son por lo general multinucleadas. Los tabiques son perforados y permiten la circulación de las corrientes citoplasmáticas como también la migración de núcleos de una célula a otra.

Esporulación

Esporulan tan rápidamente en medios de cultivo como en la naturaleza.

En general los conidios que nacen directamente de las hifas - esporulan antes que los que se forman sobre estructuras complejas (picnidios, esporangios o sinemas).

Todos los factores corrientes, como temperatura, nutrición pH, luz, etc. ... afectan la esporulación.

Se ha comprobado que exposiciones cortas a la irradiación ultravioleta estimulan la producción conidial en muchos hongos imperfectos.



Morfología de las estructuras reproductoras

— Picnidio: En ciertos grupos de hongos imperfectos los conidios se producen en cuerpos globosos o en forma de botella. La pared es pseudoparenquimatosa. Los picnidios pueden estar completamente cerrados o tener una abertura: ostiolo.

Pueden ser uniloculados, simples o labirintiformes.

Kempton en 1919, citado por Alexopoulos (1976) encontró que este grupo de hongos utiliza tres métodos para producir los picnidios:

- a) Meristogeno simple: el picnidio se origina de la división de una célula simple o de una cantidad de células vecinas pertenecientes a la misma hifa.
- b) Meristogeno compuesto: las células de diversas hifas adheridas se dividen para formar el picnidio.
- c) Sinfogeno: una cantidad de ramas hifales crecen hacia un punto común y se entretejen para formar el esbozo picnidial.

— Acervulo: Es un estrato chato, descubierto de conidioforos generalmente cortos que crecen unos al lado de otros y nacen de una masa de hifas mas o menos estromáticas.

El modo de formación del acervulo es el mismo que el picnidio con los tres tipos: meristogenos simples, compuestos y sinfógenos. Esto explica por qué se producen en algunos hongos de difícil clasificación formas intermedias entre picnidios y acervulos.

— Esporas: Se producen asexualmente y por lo general se llaman conidios. Según su origen son: microconidios, clamidosporas,

atrosporas, blastoporas, fialosporas (se forman en sucesión des de una estructura fialide en forma de botella), porosporas (esporas producidas por los poros de un conidio), etc.

Los conidios también se designan por su forma y estructura. Así tenemos: dictiosporas, escolecosporas, helicosporas.

LEVADURAS

Las levaduras aunque están incluidas dentro de las clases ya mencionadas, nosotros las estudiamos en un grupo aparte, por te ner la característica de haber perdido en gran parte su forma miceliar de crecimiento.

Poseen un talo predominantemente unicelular, se reproducen - asexualmente por gemación, división transversal (fisión) o por ambas y producen ascosporas en un asco desnudo que se origina de un cigoto o partenogenéticamente de una sola célula somática. También hay formas en las que no se conoce la producción de ascosporas. Muchas levaduras han perdido su capacidad de formar ascosporas o solo pueden formarlas en condiciones que todavía son desconocidas. A estas levaduras se las denomina asporógenas y es en las que vamos a centrar nuestro estudio.

A las levaduras se las conoce sobre todo por su capacidad de fermentar azúcares, su producción de alcohol y CO_2 y su alto - contenido en vitaminas.

Estructuras somáticas

Son unicelulares. Poseen pared celular bien definida y un nú celo pequeño rodeado de citoplasma. Una gran vacuola ocupa gran parte de la célula, habiendo otras inclusiones en el citoplasma.

Estudios electromicroscópicos parecen demostrar que la estructura general de la célula de la levadura es comparable a la de otras células.

Varían de forma según la especie y aún dentro de la misma; pueden ser globosas, ovoides, elongadas o rectangulares.

A veces forman un pseudomicelio. Observadas individualmente, las células de las levaduras parecen incoloras, pero cuando se las cultiva en medios artificiales sólidos producen colonias blancas, color crema, o están teñidas con pigmentos castaños. Estos caracteres son útiles en la taxonomía, por ser un grupo muy difícil de clasificar.

Una vez realizado el estudio anterior podemos comprobar que cada día tiene una mayor importancia el estudio de la micoflora del yogur, puesto que reúne unas condiciones idóneas para el crecimiento y desarrollo de los hongos, que pueden producir no solamente alteraciones fisiológicas en el hombre, sino el deterioro del propio producto. Lo cual es también altamente interesante desde el punto de vista industrial.

I.4. EL YOGUR COMO SUSTRATO PARA LA FORMACION DE AFLATOXINAS

Como ya dijimos en el apartado anterior los mohos pueden ser capaces de crecer y desarrollarse sobre alimentos, elaborando -- productos metabólicos de poder toxicogénico para el hombre y los animales. Estos metabolitos son las llamadas micotoxinas en general.

Todas las sustancias tóxicas producidas por hongos entran - perfectamente en esta denominación, si bien su significado práctico es distinto según el tipo de mohos que los producen, o que las sustancias tóxicas sean extracelulares (exotoxinas) o intracelulares (endotoxinas).

Hay que puntualizar que no todos los hongos son capaces de - producir micotoxinas y que la cantidad de éstas es muy variada. Por otra parte los factores que rigen el crecimiento de un hongo no son necesariamente los mismos que favorecen la producción de sustancias tóxicas.

Muchos autores manifiestan que con un contenido en agua del sustrato entre un 15 y un 20% se pueden obtener fuertes concen-- traciones de toxina, aunque la contaminación sea relativamente baja; y en cuanto a la temperatura, mientras que la óptima de crecimiento está alrededor de 30º C, pudiendo un hongo esporu-- lar hasta los 46º, la producción de toxina alcanza un máximo en tre 20 y 25º C, con unos límites de 13 a 41º C.

Dentro de este amplio grupo de micotoxinas hay que destacar unas exotoxinas o mas propiamente tóxicos elaborados por *Aspergi-- llus flavus* y *Aspergillus parasiticus* denominadas Aflatoxinas.

El nombre de Aflatoxinas hace referencia al hongo *A. flavus*, - considerado en principio como el único agente productor de la en

fermedad X de los pavos, diagnosticada en Inglaterra en 1961.

El mecanismo de síntesis de las micotoxinas no está perfectamente determinado. Debemos mencionar la hipótesis de diversos autores como Mateles, Wogan, Holker y Biollar, citados por Golblatt (1968), los cuales proponen como vía inicial de formación de aflatoxinas un acetato. Este acetato a su vez podría sintetizarse a partir de varias sustancias como son la glucosa, los ácidos grasos o los aminoácidos.

Las alfatoxinas, como metabolitos secundarios, se forman al final de la fase exponencial de crecimiento.

En general la producción de aflatoxinas sigue un camino paralelo al desarrollo del micelio. Las condiciones de aparición vienen determinadas por:

— Temperatura: la óptima sobre el cacahuete es de 25º, en cambio sobre el arroz es de 28º, un exceso de temperatura alrededor de los 40º inhibe la producción y una temperatura baja de 15º C la disminuye sensiblemente, encontrándose sin embargo ciertas cepas que la producen en refrigeradores alrededor de 5-7º C.

— Humedad: el contenido en agua del sustrato juega un papel que está en relación a las posibilidades de desarrollo del micelio y está en íntima relación con la temperatura. Se sitúa como bueno entre 15% y 30% de humedad en el sustrato, condiciones que se dan en muchos productos alimenticios.

— Oxigenación: La aireación puede provocar un aumento de micelio pero al mismo tiempo una degradación de las toxinas, y el anhídrido carbónico reduce el crecimiento y en consecuencia la producción de toxina.

— Iones minerales: Estimula la producción el zinc, cadmio,

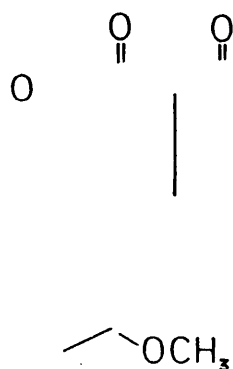
magnesio y hierro, no influyen el cobalto, cromo, calcio y manganeso, actuando el acetato de bario como inhibidor.

— pH del medio: Su óptimo está entre 4 y 5.

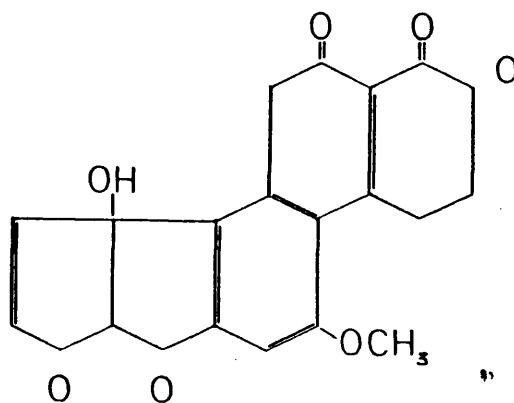
El aislamiento y caracterización de los diferentes tipos de toxinas incluidas en el llamado grupo de aflatoxinas, fue realizado por Hartley y colaboradores (1963), determinando la existencia mediante cromatografía de capa fina, de cuatro compuestos llamados aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂.

Las fórmulas moleculares fueron establecidas mediante determinación de los espectros de absorción ultravioleta, infrarrojos, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

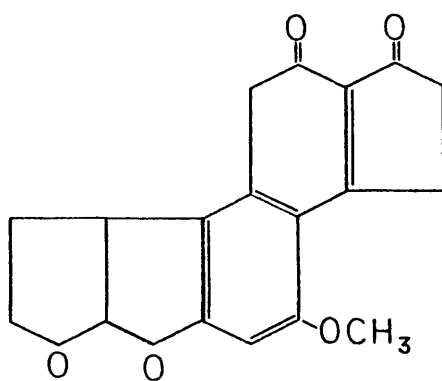
Su estructura es la siguiente:



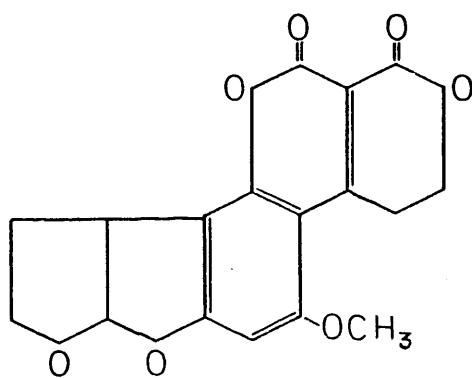
AFLATOXINA B₁



AFLATOXINA G₁



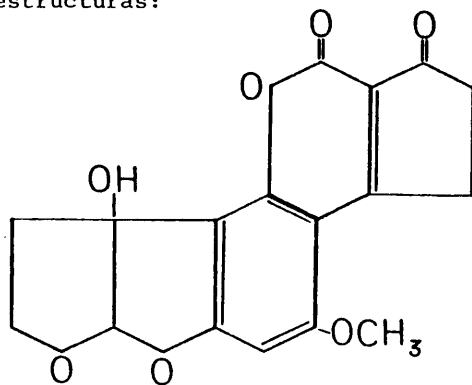
AFLATOXINA B₂



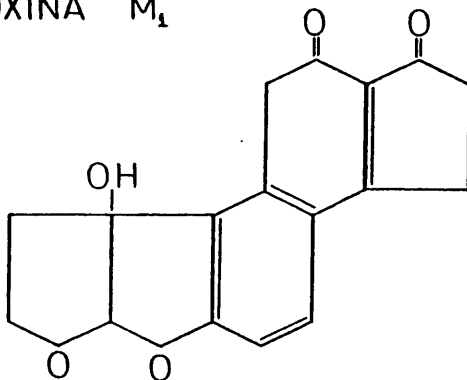
AFLATOXINA G₂

Allcroft y Carnaghan en 1963, citados por Moreau (1974), en sus búsquedas de eventuales compuestos tóxicos en la leche y carne de vaca, encuentran unas sustancias capaces de ocasionar lesiones semejantes a las aflatoxinas. Denominaron a estas sustancias a latoxina M_1 y M_2 . Descubriéndose posteriormente que la Aflatoxina M_1 era la hidroxí-4 aflatoxina B_1 y la aflatoxina M_2 la hidroxí-4 aflatoxina B_2 .

Siendo sus estructuras:



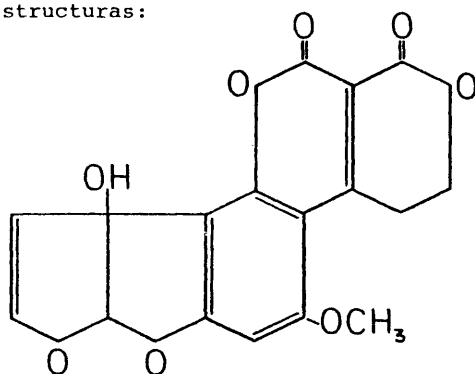
AFLATOXINA M_1



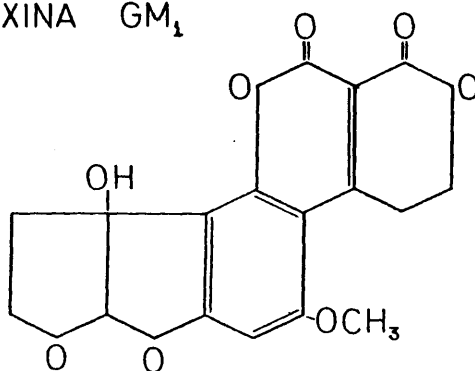
AFLATOXINA M_2

Nabney y colaboradores en 1967, citados por Heathcote(1978) aíslan un componente verde fluorescente de la orina de la oveja, al cual se le considera como una hidroxiaflatoxina G. En el mismo año Puchase y Theron realizan una aislaci3n similar en la orina de las ratas, y la denominan aflatoxina GM₁. Hibbert encuentra un nuevo metabolito con fluorescencia verde, el cual se separaba con dificultad de la aflatoxina GM₁, denominándole GM₂.

Siendo sus estructuras:



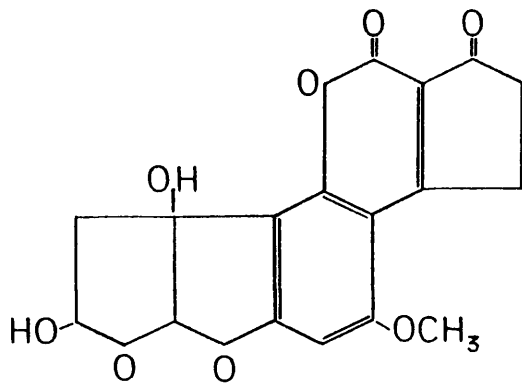
AFLATOXINA GM₁



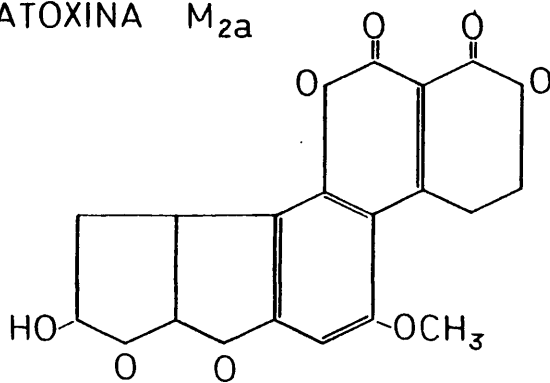
AFLATOXINA GM₂

Patterson llamó la atención sobre la posibilidad de que el hemiacetal de la aflatoxina M_1 pudiera ser formado in vitro por hígados homogeneizados o por tratamiento de la aflatoxina M_1 con ácido diluido. Se comprobó que efectivamente ésto era posible y de acuerdo con la nomenclatura existente se las denominó M_{2a} y GM_{2a} , por ser dihidroxiaflatoxinas de la serie M.

Son sus estructuras:



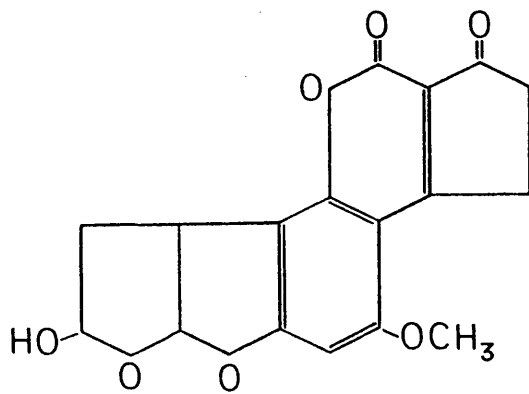
AFLATOXINA M_{2a}



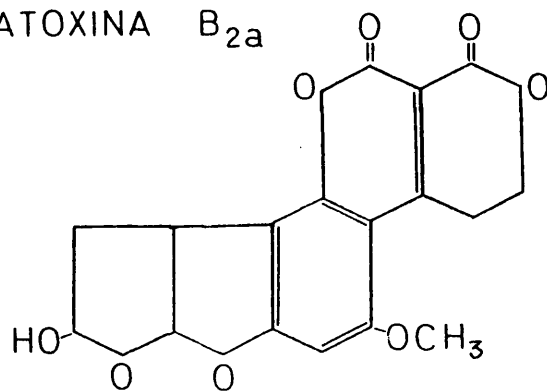
AFLATOXINA GM_{2a}

Dos nuevas hidroxiaflatoxinas, una de fluorescencia azul y otra verde, eran aisladas de cultivos de *Aspergillus flavus* Por Dutton t Heathcote (1978) en 1966. Los compuestos eran caracterizados de modo inequívoco y demostraban ser hidroxí-derivados de aflatoxinas B₂ y G₂ respectivamente. Fueron designados como B_{2a} y G_{2a}.

Son sus estructuras:



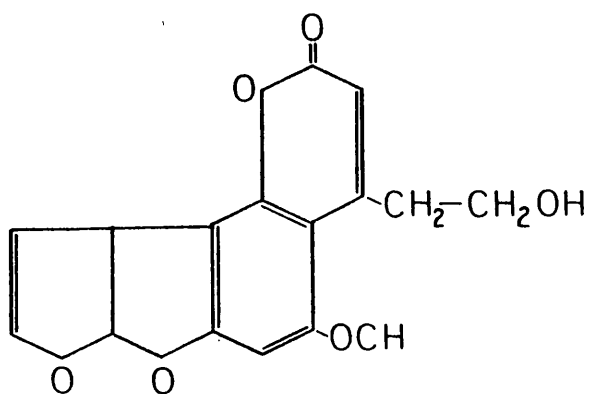
AFLATOXINA B_{2a}



AFLATOXINA G_{2a}

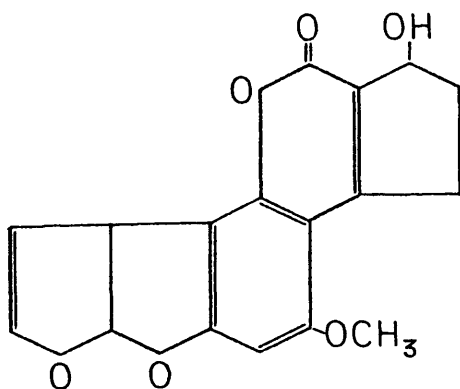
En 1969, otro compuesto azul fluorescente era aislado por Heathcote y Dutton, de un extracto de cultivo líquido de levaduras con una cepa de *Aspergillus flavus*. El metabolito era mas polar que la aflatoxina M₁ encontrada por cromatografía en capa fina. A esta estructura molecular se la denominó Aflatoxina B₃.

De un cultivo de *Aspergillus parasiticus* fue aislado un compuesto exactamente igual a la aflatoxina B₃ a la que se llamó parasitol. Resultado de que una cepa de *A. parasiticus* (N.R.R.L.2999) que producía este compuesto era aparentemente idéntico con la cepa *A. flavus* (C.M.I. 91019), el cual había sido usado en los trabajos de Salford.



AFLATOXINA B₃

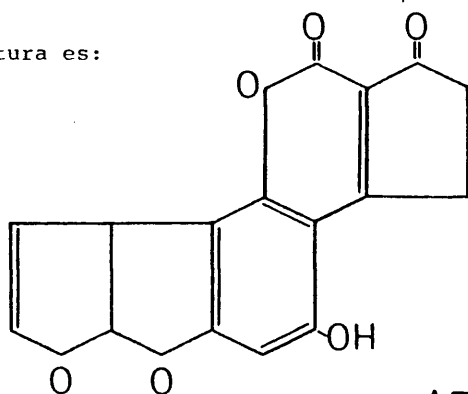
El aflatoxicol o aflatoxina R₀, es un compuesto aislado independientemente por dos grupos diferentes de trabajos, como un producto de degradación de la aflatoxina B₁ por varios microorganismos. Posee la fluorescencia propia de la aflatoxina B₁ y tiene como fórmula molecular C₁₇H₁₄O₆, correspondiendo a la estructura:



AFLATOXICOL

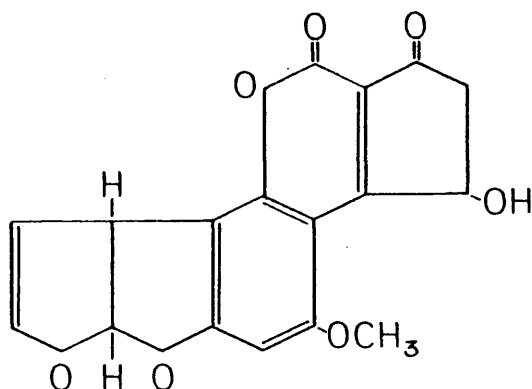
La aflatoxina P_1 está producida en trazas por la O-demetilación de la aflatoxina B_1 durante el metabolismo animal. Esta estructura ha sido establecida por síntesis química, la cual era conseguida por tratamiento de aflatoxina B_1 .

Su estructura es:



AFLATOXINA P_1

La aflatoxina Q_1 es una nueva aflatoxina encontrada al ser mejor metabolito de aflatoxina B_1 que es producida por microsomas de mono e hígado humano in vitro. Su fórmula molecular es $C_{17}H_{12}O_7$, correspondiendo a la estructura:



AFLATOXINA Q_1

La acción tóxica de las aflatoxinas a nivel bioquímico afecta a los ácidos nucleicos y a la formación de las proteínas, pudiendo considerarse como un inhibidor de síntesis que a dosis altas provocarían inhibiciones totales y a dosis pequeñas permitirían obtener efectos progresivos. Las etapas sucesivas de la acción de las aflatoxinas sobre la célula hepática han sido esquematizadas por Clifford y Res siendo cada uno de los estadios con secuencia de los efectos de la etapa precedente:

- a) Interacción con ADN e inhibición de las polimerasas responsables de la síntesis del ADN y ARN.
- b) Suspensión de la síntesis del ADN ya que las moléculas de este ácido, presentes en los núcleos de las células, ya no pueden servir de modelo para la duplicación.
- c) Reducción de la síntesis del ARN e inhibición del ARN mensajero afectando en mayor proporción al contenido citoplásmico que al nuclear.
- d) Alteraciones de la morfología nuclear.
- e) Reducción de la síntesis de las proteínas como consecuencia de las inhibiciones precedentes.

La acumulación de lipoproteínas y degeneración grasa del hígado, tendría su origen en la perturbación del metabolismo proteico.

Ofrece interés especial su actividad cancerígena sobre la célula hepática ya que ha permitido el estudio de las características de la célula cancerosa, al ser la fase de inducción del proceso muy breve sobre todo en animales jóvenes y las cantidades precisas para producir esta acción, muy pequeñas.

Las aflatoxinas es uno de los cancerígenos mas activos conocidos por via bucal, la absorción fraccionada de 2,5 mg a lo largo de unos tres meses produce al cabo de un año un cáncer de hígado. Si lo comparamos con la cantidad de colorante azoico capaz de producir efectos semejantes veremos que la dosis inductora -- sería 1.800 veces mayor.

La acción de la toxina se concreta en la aparición de carcinomas hepatocelulares multicéntricos proporcionales a las cantidades de aflatoxina ingerida.

Tiene influencia en su acción una dieta deficiente de grasa y es muy probable que actúe como un precancerígeno que es transformado en un compuesto activo por los enzimas de los microsomas.

A la vista del poder cancerígeno de la aflatoxina B₁, la mas activa de todas las conocidas, cabría atribuir la actividad cancerígena en la coexistencia del núcleo de dihidrofuro-furánico y la fracción lactona pudiendo existir "epoxidización" de la molécula a nivel del doble enlace que existe en la parte terminal difuránica de las fórmulas de las aflatoxinas B₁, G₁ y M₁ y falta en las aflatoxinas B₂ y G₂, lo que explicaría la menor actividad de estas últimas.

Finalmente la localización de los tumores puede no ser únicamente hepática, siendo posible la aparición en glandulas estomacales y pulmón, lo que induce a pensar que las aflatoxinas puede resumirse en dos efectos:

- Unos fenómenos de toxicidad aguda y de acción rápida.
- Un proceso lento de carcinogénesis.

No afectando exactamente igual a todos los animales, jugando

su importancia factores de edad, alimentación y especie, que se traduce casi siempre en la capacidad del animal de retener, metabolizar o excretar las sustancias tóxicas.

Habiendo realizado un breve estudio de las características principales de las aflatoxinas y recordando las características propias del yogur citadas en el apartado 1.3. podemos ver que - el yogur podría ser un buen sustrato para la formación de aflatoxinas, ya que, en general, es un buen sustrato para el desarrollo de los hongos y también para aquéllos que son potencialmente toxicogénicos.

Por otra parte, el pH del yogur, siempre superior a valores de 3,5 a 4 permite teóricamente la síntesis de estos metabolitos altamente tóxicos, que son las aflatoxinas.

I.5. ANTECEDENTES HISTORICOS

El origen del yogur data de épocas muy remotas. Se cita ya a los fenicios como conocedores del mismo, aunque parece ser que su área inicial de origen se halla situada en la región de los Balcanes y la Turquía Asiática, donde sus habitantes preparaban el mismo por acidificación espontánea de la leche.

Las primeras noticias de su introducción en los países occidentales apuntan hacia un médico judío, oriundo de Constantinopla, quien en la primera mitad del s. XIV consiguió solucionar un problema de trastornos intestinales a Francisco I, rey de Francia.

No divulgó el secreto del preparado y fue preciso esperar hasta el presente siglo para conocer y apreciar este derivado lácteo.

Fue gracias a los trabajos de Metchnikoff del Instituto Pasteur en 1907, citado por Davis (1974) cómo este producto alcanzó popularidad y difusión, ya que llegó a asegurar que de su consumo se derivaba en buena medida la longevidad humana, aportando como justificación numerosos casos de longevidad en habitantes de las zonas tradicionales de consumo.

Ya en 1901 Beijerinck, citado por Tittsler (1952), estudia el yogur y propone la denominación de *Lactobacillus* y *Lactococcus* a los microorganismos responsables de la fermentación del yogur.

En 1919 Orla-Jensen, citado por Tittsler (1952), sugiere la separación de las especies homofermentativas de los tipos heterofermentativos y propone darles nuevos nombres.

En 1926 Orla-Jensen (Tittsler, 1952) incluye los dos géneros antes mencionados dentro de la familia Lactobacillaceae, afir

mando que eran unos bacilos largos acidolácticos.

Desde que en 1901 Beijerinck denominó *Lactococcus* a uno de - microorganismos indispensables en la elaboración del yogur, hasta 1937 en que Sherman propuso el nombre definitivo de *Streptococcus*, fueron muchos los autores que propusieron diversos nombres.

A pesar de todo, en Estados Unidos y Canadá el éxito del yogur no se alcanza hasta bien entrados los años cuarenta de este siglo, y algo parecido sucedió en otros muchos países occidentales.

Wilson y Miles (1976) estudian los principios de la bacte--riología e inmunología.

Posterioros trabajos estudian la calidad microbiológica dese de el punto de vista de la contaminación en el yogur, como por - ejemplo el estudio sobre *Salmonella* en yogur por Hobbs en 1972, citado, por Robinson (1981) el realizado sobre *Staphylococcus* por Thus, Arnott en 1974 (Robinson, 1981).

Aunque con respecto a las investigaciones en torno a la mi-croflora del yogur hay numerosas referencias bibliográficas, hay - que destacar la gran ausencia de estudio sobre la micoflora de este producto.

Con respecto a los antiguos autores, solamente nos hemos encontrado una cita sobre la contribución de las levaduras en la - elaboración de otro producto lácteo: el kefir, que data de 1889 y cuyo autor Beijerinck es citado por Tittsler (1952). Este trabajo afirma que el kefir es una mezcla de bacterias acidolácticas, le-vaduras y formas esporuladas.

En la actualidad, pese a la importancia del yogur por su - gran consumo, conocemos muy pocos investigadores que hagan refe-

rencia al estudio que nos ocupa.

Entre ellos podemos citar a Davis (1971), el cual introduce la idea de que la contaminación por levaduras puede tener grandes repercusiones.

A Tilbury (1974), el cual hace un estudio taxonómico de las levaduras encontradas en el yogur y otros productos lácteos. Y a un numeroso grupo de autores como son Hup (1973), Koburger (1975) Martínez Pardo (1978), Rodríguez Ferri (1978), etc., ... los cuales al estudiar la microflora del yogur incluyeron la microflora - desde un punto de vista cuantitativo y someramente cualitativo.

Pese a que en los tiempos actuales, debido a la tecnología moderna, se nos garantiza una mayor y mejor calidad del producto, hay que tener en cuenta un problema relacionado con la microflora: la micotoxicosis y dentro de ella la aflatoxicosis.

Son muchos los trabajos realizados sobre este tema en productos lácteos, principalmente en queso y leche.

Así podemos destacar los realizados por Purchase (1967,68), Massi (1968), Schuller (1973), Goded (1975), Kiermeier (1976,77), Polzhofer (1977), Van Egmond (1977), Sutic (1978), Stubblefield (1979).

Sin embargo en el producto sobre el que estamos estudiando solamente hemos podido encontrar un trabajo, que ha sido el realizado por Polzhofer en 1977.

II. OBJETO E INTERES

Dada la ausencia de estudios experimentales sobre el tema que nos ocupa, el objeto de este estudio y su posible interés radica en llegar a un mejor conocimiento de la micoflora del yogur, así como la investigación de las posibles cepas productoras de aflatoxinas y su capacidad para producir dichos metabolitos en el producto a estudiar.

Es importante destacar el notable incremento en el consumo - que ha experimentado este alimento en la actualidad, dadas sus especiales características nutritivas y de digestibilidad que le hacen ser un producto básico en la alimentación humana y especialmente en los niños y en ancianos, lo que es muy importante, por ser éstos los sectores sociales mas sensibles de la población ante una agresión microbiana.

En consecuencia con estas ideas, el desarrollo de este trabajo va a constar de tres partes de máximo interés:

- En una primera que nos referiremos al estudio de la micoflora contaminante del yogur.
- Una segunda en la que estudiaremos las estirpes aisladas - de dicho producto y su posible producción de aflatoxinas en condiciones óptimas de cultivo y en una experimentación dirigida a nivel de laboratorio.
- Y un tercer estudio sobre la inoculación de estas especies aflatoxicogénicas y otras de colección en dicho producto y la posible formación de aflatoxinas en el mismo.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ESQUEMA DEL TRABAJO

III.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En primer lugar la carencia de estudios sobre la micoflora del yogur hacen que un trabajo de este tipo represente inicialmente, cualesquiera que sean sus resultados, una aportación útil al conocimiento taxonómico de la micoflora presente y sobre diversos aspectos sanitarios.

En segundo término la posibilidad de que se hallen presentes micotoxinas en el producto puede depender, con probabilidad muy remota, de la presencia de éstas en el sustrato. Ello sólo sería posible para las aflatoxinas M_1 y M_2 , hidroxiderivados que se eliminan por la secreción láctea.

La otra vía que podría explicar la presencia de aflatoxinas en el yogur, puesto que, teóricamente, ninguna de las características estudiadas constituyen un factor limitante para la síntesis de estos tóxicos, sería la propia contaminación del producto con hongos potencialmente aflatoxigénicos.

En este caso la posibilidad tendría que apoyarse en la permanencia del producto a la temperatura ambiente durante parte del tiempo de validez del producto para consumo humano o período de caducidad.

Es evidente que ésto no puede suceder si se sigue la norma legal de mantener el producto refrigerado, pero sería posible, y de hecho lo es con relativa frecuencia, que el producto alcanza la temperatura ambiente en algún punto de la cadena comercial.

Esto nos lleva a considerar el interés por conocer la micoflora presente en el yogur desde un punto de vista cuantitativo y cualitativo, su potencialidad patógena, en general, y de forma-

ción de micotoxinas en medios óptimos y en especial de aflatoxinas en el propio yogur.

El posible peligro remoto de la presencia de una micoflora patógena se compensa en un sentido de la mayor peligrosidad si pensamos en el elevado consumo que hacen de los derivados lácteos personas enfermas, inmunodeprimidas, niños y ancianos.

En armonía con las ideas anteriores hemos diseñado el proyecto que se apoya en los puntos siguientes:

1. Estudio taxonómico, estadístico y de variación de la micoflora presente en el yogur.
2. Caracterización de los hongos potencialmente patógenos.
3. Inducción de la formación de aflatoxinas sobre medios y en condiciones óptimas.
4. Investigación de la posibilidad de sintetizar aflatoxinas en el propio yogur utilizando estirpes aisladas del producto y otras de colección.

III.2. ESQUEMA DE TRABAJO

Concretados los puntos básicos a los que nos vamos a referir, y a la vista de los objetivos que nos proponemos alcanzar, corresponde ahora programar un modelo experimental idóneo que nos lleve a conseguir los objetivos propuestos.

Con tal fin y tras un ensayo experimental previo, hemos adaptado a nuestro problema concreto el siguiente esquema de trabajo:

1. Recogida de muestras.
2. Recuento de los hongos.
3. Aislamiento de las colonias y obtención de cultivos puros.
4. Identificación.
5. Conservación de las estirpes aisladas.
6. Comprobación de especies aflatoxicogénicas sobre un medio idóneo.
7. Inoculación de las especies aflatoxicogénicas en el propio yogur.
8. Elaboración de los datos y tratamiento estadístico.
9. Resultados.
10. Discusión.
11. Conclusiones.

IV. MATERIAL Y METODOS

IV.I. MATERIAL UTILIZADO

IV.I.I. MATERIAL EMPLEADO PARA EL ESTUDIO DE LA MICROFLORA

El estudio de la micoflora contaminante del yogur se ha realizado sobre un total de 473 muestras.

Para la toma de muestras se eligieron tres marcas de yogur, seleccionándose cada una de ellas por ser en los momentos actuales las mas consumidas y, por tanto, las mas representativas en cuanto a su calidad microbiológica. A lo largo de nuestro estudio, nos referirémos a ellas denominándolas: marca A, marca B, marca C.

A la vez, dentro de cada una de las marcas, consideramos tres tipos de sabores: natural, fresa y plátano. Y dentro de éstos hicimos dos lotes, llamándoles: yogures iniciales y finales. Es decir, recién elaborados y los que eran analizados el día de su fecha de caducidad, para así poder comprobar si había alguna diferencia significativa en cuanto a su grado de contaminación, dis-tribuyéndose de la siguiente manera:

Marcas Tipos	A	B	C
Natural	53	51	50
Fresa	52	53	50
Plátano	54	52	52
TOTAL	159	156	158

De la misma manera que con las marcas, la elección de estos tres tipos de yogur se hizo en base a que resultaron ser los mas vendidos en todo el Territorio Nacional, y en consecuencia con un mayor grado de representatividad.

El material empleado en el desarrollo de este trabajo, es el que corrientemente se utiliza para la realización de cualquier investigación microbiológica en general: autoclaves, horno Pasteur, estufas de cultivo, placas de Petri, etc., y un material específico que podemos resumir en:

- Medios de cultivo idóneos, citados y detallados en el apartado IV.2.
- Cámara clara, marca Leitz^R, con el fin de dibujar los distintos hongos a una escala determinada. Esta se ha ajustado de manera que con el objetivo de inmersión a 10 micras reales le correspondan 1,5 cm. en el dibujo. Este es el ajuste empleado siguiendo las técnicas de Lodder (1974), Ellis (1976) y De Vries (1967).

IV.1.2. MATERIAL EMPLEADO EN LA INVESTIGACION DE AFLATOXINAS

IV.1.2.1. Material empleado para el estudio de cepas toxigénicas

Basado en la técnica analítica para la determinación de aflatoxinas de Gimeno Ciriano (1979),

Aparatos

a) Agitador de vaivén: tipo HERON^R.

b) Ampollas piriformes, de color ámbar con un volumen útil de

unos 130-140 ml con un estrechamiento en uno de los extremos de unos 4 cm de largo por 1 cm de diámetro; dicho estrechamiento graduado con divisiones en décimas de cm (1/10), en el otro extremo tienen un esmerilado 29/32 -- adaptable a rotavapor y a tapón de vidrio.

- c) Rotavapor HEIDOLPH^R VV1, con baño maría tipo UNIVEBA^R-401.
- d) Microjeringas de 10 ml con aguja fina segmentada y punta cortada a 90°, el émbolo con punta de teflón tipo HAMILTON^R.
- e) Dispensador repetitivo tipo HAMILTON^R, adaptable a las microjeringas anteriores.
- f) Miniviales tapón de rosca.
- g) Pulverizador cromatográfico tipo DESAGA^R N°124010.
- h) Bastidor de placas, tipo DESAGA^R.
- i) Divisor de placas (peine trazador).
- j) Cámara de secado, tipo DESAGA^R N°124050.
- k) Armario secador, tipo DESAGA^R N°124020.
- l) Cámaras de desarrollo, tipo DESAGA^R N°120167.
- m) Cámara ultravioleta, CAMAG^R standar N°29200 con luz UV de 366 nm SYLVANIA F8TS^R/BLB USA y luz UV de 254 nm SYLVANIA GERMICIDAL^R G8TS.

Reactivos

a) Para extracción y limpieza

- Acetonitrilo, Merck^R.
- Solución acuosa de cloruro potásico 49/100 ml Merck^R.
- Isooctano CLH-1,0 Merck^R.
- Agua destilada.
- Cloroformo, Merck^R.
- Papel de filtro Whatman^R 40 de 9 cm de diámetro.
- Sulfato sódico anhidro, Merck^R.

b) Soluciones de ácido sulfúrico (1/3) en agua destilada.

c) Acido trifluoracético (1/1) diluído en benceno o cloroformo.

d) Patrones standar de aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, SIGMA^R.

e) Placas de cromatografía de capa fina TLC, preparadas -
con Sil G-25 HR (silicagel y yeso) sin indicador de --
fluorescencia, de 20 X 20, Merck^R.

f) Solventes de desarrollo:

- Cloroformo
 - Acetona
- } cloroformo/acetona (176/24).



IV.1.2.2. Material empleado en la producción artificial de aflatoxinas

Basado en la técnica analítica para determinación de aflatoxinas de Schuller (1973).

Se han utilizado inoculos de estirpes toxigénicas tratando de inducir la formación de aflatoxinas en condiciones experimentales determinadas, utilizando el yogur como sustrato.

Aparatos.

- a) Columna de cromatografía (600 X 45 mm).
- b) El resto de los aparatos utilizados en esta técnica son - los descritos en el apartado IV.1.2.1.

Reactivos.

- a) Para extracción y limpieza

- Acetona, Merck^R.
- Celite lavado con ácido, Serva^R.
- Cloroformo, Merck^R.
- Metanol, Merck^R.
- N pentano, Merck^R.
- Agua destilada.
- Cloruro sódico, Merck^R.

Otros reactivos utilizados son los ya descritos a partir del punto b) en el apartado IV.1.2.1.

IV.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo para hongos están constituidos en su mayoría por una base fundamental de azúcares, extracto de malta y de levadura y en algunos casos, como veremos mas adelante, por sales minerales.

El hecho de que un medio de cultivo no posea componentes naturales en su fórmula dificulta la esporulación adecuada e impide el desarrollo de ciertos géneros, aún cuando se hallen presentes en el yogur muestreado.

Todas las esporas que se depositen en una placa de Petri, deben encontrar en ella un medio nutritivo favorable para su desarrollo.

IV.2.1. Medios de cultivo empleados para la recogida de mues- tras

Los medios empleados fueron los siguientes:

A) AGAR EXTRACTO DE MALTA AL 3%^R.

Medio empleado por Tilbury, Rossi, Koburger, Holwerda, Coleman y Bender (citados por Hup. 1973).

Su composición es la siguiente:

Extracto de Malta	30 g
Peptona	5 g
Agar	17 g
Agua destilada	1.000 cc

El pH se ajusta entre 4, 6 y 5, esterilizando a una atmósfera de presión durante 20 minutos.

B) AGAR CON SOLUCION DE CZAPEK-DOX^R.

La composición de este medio se caracteriza por la diversidad de sales minerales que posee, que si bien no favorece la presencia de una esporulación abundante, permite un adecuado crecimiento de las colonias, así como la formación de gotas de exudado y de pigmento difusible en el medio de cultivo.

Su composición es:

NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
Sacarosa	30 g
Agar	16 g
Agua destilada	1.000 cc

El pH final se ajusta a 7,3. Se esteriliza a una atmósfera de presión durante 15 minutos.

C) AGAR CON SOLUCION DE CZAPEK ADICIONADO DE EXTRACTO DE LEVADURA.

Su composición es la misma que la expuesta anteriormente, pe

ro con una adición de 6 g de extracto de levadura, para enriquecimiento del medio, ya que a algunos mohos les es insuficiente la composición de Czapek.

D) AGAR GLUCOSADO DE SABOURAUD.

Este medio de cultivo es una modificación del medio Agar con Dextrosa descrito por Sabouraud.

Su composición es:

Neopeptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 cc

Se ajusta el pH a 5,6 y se esteriliza a una atmósfera de presión durante 20 minutos.

Este medio tiene la ventaja de contener neopeptona que es una fuente muy rica de nitrógeno y facilita el desarrollo de los hongos.

A estos cuatro medios utilizados para la recogida de muestras se les agrega 5 g ppm de oxitetraciclina con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano.

IV.2.2. Medios de cultivo utilizados en los estudios taxonómico y toxicogénico

IV.2.2.1. Medios empleados para el aislamiento e identificación de mohos a nivel de género

a) Agar extracto de Malta al 3%. Descrito en el apartado -
IV.2.1.A.

b) Agar con solución de Czapek. Descrito en el apartado -
IV.2.1.B.

IV.2.2.2. Medios empleados en la identificación de mohos a
nivel de especie

A) Para la identificación de las especies del género *Cladosporium* empleamos los medios de cultivo que propone De Vries (1967) en su monografía sobre dicho género.

Estos medios son:

— Agar glucosa, cuya composición es:

KNO ₃	2	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5	g
KH ₂ PO ₄	1	g
Glucosa	50	g
Agar	20	g
Agua destilada	1.000	cc

Se ajusta el pH a 5,4 y se esteriliza a una atmósfera de -
presión durante 20 minutos.

— Agar con solución Czapek-Dox, descrito en el apartado
IV.2.1.B..

— Agar extracto de Malta, descrito en el apartado IV.2.1.A.

B) Medios de cultivo empleados para la identificación de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* a nivel de especie.

Empleamos los medios que recomiendan Raper y Thom (1949) en sus monografías para el estudio de los géneros.

— Agar con solución Czapek-Dox, descrito en el apartado IV.2.1.B.

— Agar extracto de Malta al 3%. Descrito en el apartado IV.2.1.A.

C) Medio de cultivo empleado para la identificación de especies del género *Alternaria*. Para este género empleamos el medio descrito por Joly (1964).

— Agar extracto de Malta al 5%, que está compuesto por:

Extracto de Malta	50 g
Glucosa	20 g
Peptona	1 g
Agar	25 g
Agua destilada	1.000 cc

Se esteriliza a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Ajustando a un pH final de 4,5.

IV.2.2.3. Medios empleados en la identificación de levaduras

Para la identificación de levaduras hemos adoptado el criterio seguido por Lodder (1974), según el cual tenemos que considerar sus características morfológicas, fisiológicas y de reproducción. Con este fin, hemos empleado en cada caso medios de cultivo que por su composición y propiedades nos ponen de manifiesto las características que estudiamos.

IV.2.2.3.1. Medios para el estudio de las características MORFOLOGICAS

A) Con el fin de observar la forma y tamaño de las células vegetativas y estudiar la capacidad de formación de velo y anillo, se empleó extracto de Malta (Lodder, 1974).

Este medio está constituido por extracto de Malta al 2% en agua destilada. Ajustando el pH a 5,4 se esteriliza a una atmósfera de presión durante 15 minutos.

B) Medio de Agar con harina de maiz Bernhardt.

Este medio nos pone de manifiesto la capacidad de formar pseudomicelio que presentan algunos tipos de levaduras. Su composición es la siguiente:

Infusión de harina de maiz	50 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 cc

Ajustando el pH a 5, se esteriliza posteriormente a una atmósfera de presión durante 15 minutos.

IV.2.2.3.2. Medios para determinar las características FISIO-
LOGICAS

A) Medio para el estudio de la capacidad fermentativa de distintos azúcares. Composición del medio:

Extracto de levadura	6 g
Agua destilada	1000 cc
Azúcar a estudiar su fermentación*	

*Se añade el 2% de azúcar en estudio (1) salvo en el caso de la rafinosa que se adiciona al 4%. Los tubos tienen campana de fermentación o de Dürhan. El medio se esteriliza a una atmósfera de presión durante 15 minutos.

(1) Los azúcares que se ensayan son: Glucosa, Galactosa, Sacarosa, Maltosa, Lactosa, Rafinosa, Melibiosa, Trehalosa y Melizito.

B) Medios de cultivo empleados para el estudio de la asimilación de Hidratos de Carbono.

El medio que empleamos para esta prueba es el comercializado por la firma Difco^R, según la composición propuesta por Wickerham, citado por Lodder (1974).

— Medio base de Nitrógeno para levaduras. Composición del medio:

Sulfato amónico	5,0	g
Monohidrocloreto de 1 histamina	10	mg
D L. metionina	20	g
D L. triptofano	20	g

Biotina	2	g
Pantotenato cálcico	400	mcg
Acido fólico	2	mcg
Inositol	2000	mcg
Niacina	400	mcg
Ac.p. aminobenzoico	200	mcg
Hidrocloruro de piridoxina	400	mcg
Riboflavina	200	mcg
Hidrocloruro de tiamina	400	mcg
Ac. bórico	500	mcg
Sulfato de cobre	40	mcg
Yoduro potásico	100	mcg
Cloruro férrico	200	mcg
Sulfato de magnesio	400	mcg
Molibdato sódico	200	mcg
Sulfato de zinc	400	mcg
Fosfato potásico monobásico	1	g
Sulfato magnésico	0,5	g
Cloruro sódico	0,1	g
Cloruro cálcico	0,1	g
Agar	20	g
Agua destilada	1000	cc

Se suspenden 6,7 gramos de esta mezcla en 1000 ml de agua - destilada, se esteriliza por filtración, en filtro Millipore^R, re partiéndose a continuación 0,5 ml de medio en tubos esteriles que contienen 4,5 ml de agua destilada. El pH final se ajusta a 5,6.

C) Medio base de Carbono para levaduras.

Su composición es la siguiente:

Glucosa	10	mcg	
Monohidrocloruro de L-histamina	1	mg	
D L-Metionina	2	mg	
D L-Triptofano	2	mg	
Biotina	2	mg	
Pantotenato cálcico	400	mcg	
Ac.fólico	2	mcg	
Inositol	2000	mcg	
Niacina	400	mcg	
Ac.p. aminobenzoico	200	mcg	
Riboflavina	200	mcg	
Hidrocloruro	200	mcg	
Ac.bórico	500	mcg	
Sulfato de cobre	40	mcg	
Yoduro potásico	100	mcg	
Cloruro férrico	200	mcg	
Sulfato de magnesio	400	mcg	
Molibdato sódico	200	mcg	
Sulfato de zinc	400	mcg	
Fosfato potásico monobásico	1	g	
Sulfato magnésico	0,5	g	9,
Cloruro sódico	0,1	g	
Cloruro cálcico	0,1	g	
Agar	20	g	

Agua destilada 1000 cc

El medio se esteriliza por filtración, a partir de una solución de 11,7 gramos en 1000 ml de agua destilada.

Transfiriendo 0,5 ml de ésta en tubos de ensayo que contienen 4,5 ml de agua destilada esteril. El pH final se ajusta a 5,6.

D) Medio base carente de vitaminas.

Este medio nos sirve, en primer lugar, para detectar las vitaminas que necesitan las levaduras para crecer y en segundo lugar, para valorar la capacidad de crecimiento en su ausencia.

Este medio contiene el suficiente nitrógeno y carbono para facilitar el desarrollo de las levaduras en él, después de la adición de las vitaminas necesarias, según lo descrito por Wickerham (Lodder, 1974).

A continuación detallamos los componentes de este medio:

Sulfato amónico	5 g
Glucosa	10 g
Monohidrocloreto de L-histidina	10 g
D L. Metionina	20 g
D L Triptofano	20 g
Ac. bórico	500 mcg
Sulfato de cobre	40 mcg
Yoduro potásico	100 mcg
Cloruro férrico	200 mcg
Sulfato de magnesio	400 mcg

Molibdato sódico	200	mcg
Fosfato potásico monobásico	1	g
Sulfato magnésico	0,5	g
Cloruro sódico	0,1	g
Cloruro cálcico	0,1	g
Agua destilada	1000	cc

Se prepara una solución de 16,7 gramos en 1000 ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración. Se añade luego en condiciones asépticas 0,5 ml de este filtrado a tubos que contienen 4,5 ml de agua destilada esteril. Finalmente se adicionan al medio base las distintas vitaminas, para llegar a conocer cuáles de ellas son necesarias para el desarrollo de la levadura en estudio.

IV.2.2.3.3. Medios para definir las características de REPRODUCCION

A) Medios de cultivo para el estudio de esporulación.

Con este fin hemos empleado cuatro medios distintos:

— Agar Gorodkova, cuya composición cuantitativa es la siguiente:

Glucosa	1 g
Peptona	10 g
ClNa	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 cc

Se esteriliza a una atmósfera de presión durante 15 minutos.

— Medio de Starkey:

PO_4HK_2	0,8	g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,2	g
$\text{SO}_4\text{Mg}7\text{H}_2\text{O}$	0,2	g
Lactosa	0,025	g
Agar	15	g
$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_27\text{H}_2\text{O}$	20	g
Agua destilada	1000	cc

Se esteriliza durante 15 minutos a una atmósfera de presión.

— Medio Adams

Glucosa	0,4	g
Acetato sódico anhidro	1,4	g
Agar	20	g
Agua destilada	1000	cc

Se esteriliza durante 15 minutos a 120° C.

— Medio V_8 de esporulación:

Concentrado de verduras V_8	100	ml
Levadura de panadería	40	g

Se ajusta el pH a 6,8. Se esteriliza a vapor fluente durante 10 minutos. Enfriar y ajustar pH a 6,8.

En otro matraz:

Agar	4 g
Agua destilada	1000 cc

Disolver calentando y añadir a la mezcla anterior. Esterilizar el conjunto durante 15 minutos a 120° C y distribuir en tubos inclinados.

B) Para poner de manifiesto la capacidad de formar ascos y ascosporas, empleamos Agar patata dextrosa, recomendada por Ingram, Mossel, Beech y Carr, citados por Hup (1973).

Está compuesto por:

Infusión de patatas	200 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 cc

Se esteriliza a una atmósfera de presión durante 20 minutos.

IV.2.2.4. Medios para inducir la producción de aflatoxinas

El medio utilizado fue trigo machacado. Siendo su composición:

Trigo machacado	50 g
Agua destilada	50 cc

Se esteriliza a 120° C durante 15 minutos.

IV.2.3. Soluciones y colorantes

A) Solución Ringer al 1/4.

Fue utilizada en la recogida de muestras en la preparación de las diluciones decimales.

Su composición es:

ClNa	0,9	g
Cloruro potásico	0,042	g
Cloruro cálcico	0,048	g
Bicarbonato sódico	0,02	g
Agua destilada	400	cc

Se esteriliza a 120º C durante 20 minutos.

B) Lactofenol

Se utilizó para preparaciones microscópicas en fresco de mohos.

Su composición es:

Acido láctico	100	ml
Fenol	100	g
Glicerol	200	ml
Agua destilada	100	ml

Se disuelve el fenol en el agua sin calentarla y se añade después el ácido láctico y el glicerol.

C) Azul de metileno de Loeffler. Para tinciones simples.

Solución de hidróxido potásico al 1%	1 ml
Azul de metileno, sol. saturada en etanol al 95%	30 ml
Agua destilada	100 ml

IV.3. METODOS DE ESTUDIO

IV.3.1. Método de recogida de muestras

Las muestras utilizadas para nuestro estudio nos fueron ofrecidas por las casas comerciales productoras de los yogures a estudiar.

Estas mismas casas se encargaron de transportar en camiones frigoríficos las muestras hasta un establecimiento alimentario - de productos lácteos, desde donde eran recogidos en pequeñas neveras portátiles y trasladadas hasta nuestro laboratorio para su posterior investigación.

Hasta el momento de su análisis eran almacenadas en cámaras frigoríficas a 4º C, iniciándose el mismo antes de las 24 horas de la recepción.

Cada muestra iba marcada con un número correlativo de entrada, acompañado de datos de la misma: marca, tipo, fecha de recogida y fecha de caducidad. En todas las muestras se comenzó la investigación a los dos días de su fabricación.

IV.3.2. Método de recuento y aislamiento de colonias

Los medios de cultivo empleados han sido Agar extracto de Malta al 3%, Agar con solución de Czapek-Dox, Agar con solución de Czapek adicionada de extracto de levadura y Agar glucosado según Sabouraud, medios empleados por diversos autores como ya citamos anteriormente en los apartados IV.2.1.A., B., C., D.

Nuestro método de trabajo para el recuento de mohos y levaduras se basó en las diluciones decimales. En las cuales utilizamos la solución Ringer como diluyente, distribuyendo dicha solución en tubos de ensayo a razón de 9 ml por tubo.

La muestra momentos antes y después de abrirla es flameada - con el fin de que no se contamine; posteriormente con una pipeta esteril se toma 1 ml del yogur y se introduce en un tubo de ensayo que contiene 9 ml de solución Ringer; esta mezcla se lleva a un agitador excéntrico con el fin de homogeneizarlo.

Este primer tubo lleva la titulación 1/10. De este tubo se recoge con otra pipeta esteril 1 ml y se deposita en otro tubo conteniendo la misma cantidad de diluyente y posteriormente homogeneizándolo convenientemente.

Teniendo de esta manera la titulación 1/100. Así sucesivamente, hasta obtener el número de diluciones deseadas. En nuestro caso sólo hicimos dos.

A continuación de estos tubos, se recoge 1 ml de cada uno de ellos y se deposita en las placas ya preparadas de los 4 medios - de cultivo citados anteriormente.

Junto a las siembras realizadas con las dos diluciones se lleva a cabo una siembra directa de la muestra.

Posteriormente, las placas se incubaron invertidas en estufa a 22° C durante el período necesario para que las colonias alcanzasen un desarrollo conveniente.

Una vez que las colonias de los distintos hongos alcanzan un grado de desarrollo adecuado en el medio inicial, se procede al aislamiento de cada una de ellas, con el fin de obtener los cultivos puros. Los medios utilizados normalmente han sido Agar extracto de Malta y Agar con solución Czapek-Dox.

IV.3.3. Métodos de identificación.

IV.3.3.1. Métodos de identificación a nivel de GENERO

Una vez obtenido el cultivo puro de una cepa, para poder incluirlo en el género a que pertenece, se ha seguido la pauta de identificación que pasamos a describir.

Por medio de la lupa estereoscópica, se ha hecho una observación de la colonia que nos permite conocer su morfología y su forma típica de crecimiento.

Después y con ayuda de las agujas enmangadas, se separa un fragmento de colonia, se coloca sobre el portaobjetos, en el que previamente se ha puesto una gota de lactofenol, se trocea, se extiende y se pone el cubre sobre la preparación, observándola al microscopio a distintos aumentos; posteriormente se dibuja con ayuda de la cámara clara con el fin de estudiar con detalle y medir las estructuras características: conidioforo, hifas, conidios, etc.

En el caso de que tengamos una colonia con esporulación abundante, se pone un fragmento en un tubo de ensayo en el que hay un cc de dilución 0,01% de Tween 80 en agua destilada, se agita para que se desprendan las esporas del conidioforo y poder observar su forma, a continuación se monta la preparación sobre porta y cubre y se procede como se ha descrito antes.

Con toda la información obtenida de la estirpe en estudio, se pasa, mediante el empleo de las claves, a determinar el género de que se trata. En el presente estudio, se ha utilizado la obra de Von Arx (1981) como básica, empleando en algunos otros casos tratados como los de Barnett (1972), Ainsworth (1965-1973), Barron (1977), Ellis (1976), Smith (1963).

MICROCULTIVOS

Algunas cepas no se pudieron identificar por el método descrito anteriormente; en estos casos ha sido necesario recurrir a la técnica del microcultivo.

La teoría consiste en que el cultivo se realiza sobre un portaobjetos previamente recubierto de una capa fina de medio de cultivo apropiado, haciéndose la siembra de la colonia a estudiar sobre el porta. Una vez sembrada, se incuba en estufa, en el interior de una placa de Petri esteril, en la que se coloca una varilla en forma de V y encima de ella el portaobjetos. Para conseguir un grado de humedad idóneo se pone en el interior de la placa de Petri un papel de filtro esteril impregnado de glicerol al 30%, también esteril.

La incubación se hizo a 22° C durante 3 ó 4 días, observando luego a distintos aumentos, con el fin de estudiar con detalle las estructuras del hongo.

El medio de cultivo empleado ha sido Agar extracto de Malta al 3% descrito anteriormente en el apartado IV.2.1.A.

Otro problema se plantea con las cepas que no esporulan en el medio de cultivo inicial; en este caso, se intenta lograr la esporulación por siembras simultáneas en distintos medios, si la cepa se mantiene esteril se incluye dentro del grupo, orden Micelia - Sterilia.

Los medios probados con este fin fueron: Sabouraud, Sabouraud glucosado, Sabouraud maltosado y Agar harina de maiz, medios ya descritos en el apartado IV.2.

IV.3.3.2. Métodos de identificación a nivel de ESPECIE.

Conocido el género a que pertenece, se pasa por medio del es-

tudio de las características taxonómicas diferenciales, que se encuentran descritas en las monografías publicadas de los distintos géneros existentes, a determinar de qué especie se trata.

A este nivel, existe la dificultad de una bibliografía escasa y con falta de actualización.

IV.3.3.3. Método de identificación de LEVADURAS

Siguiendo los criterios de Lodder (1974) para la identificación de levaduras, debemos tener en cuenta las características morfológicas, fisiológicas y de reproducción.

IV.3.3.3.1. Características morfológicas.

Dentro de este apartado, vamos a considerar el estudio de la forma y tamaño, la forma de velo y anillo, la formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero.

A) Estudio de la forma y tamaño.

Se inoculó en extracto de malta líquido 0,1 de una suspensión de levadura, incubando después a 22º C durante 48 horas, transcurrido este tiempo se montó una gota entre porta y cubreobjetos y se observó con el objetivo de inmersión, dibujando las células con ayuda de la cámara clara para poder conocer los tamaños.

B) Capacidad de formación de velo y anillo en la superficie de cultivo.

La siembra también se realiza en extracto de malta dejando el cultivo en incubación 48 horas a 22º C. Si en este tiempo se observa en la superficie un anillo o un velo de crecimiento esto significa que hay formación temprana, si en este tiempo no se

han formado, se siembra en matraces de 250 cc y se incuba durante un mes, si transcurrido este tiempo no ha habido formación, se considera que la cepa no tiene capacidad de formar ni velo ni anillo.

C) Para el estudio de la capacidad de formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero, se sigue la técnica de los microcultivos, descrita en el apartado IV.3.3.1.

El medio empleado en este caso es agar harina de maiz, la siembra se hace en estria colocando sobre ella el cubreobjetos, se incuba a 22º C y se observa a los 6 días al microscopio, pudiéndose ver si hay o no formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero en aerobiosis y anaerobiosis, en tal caso se dibuja con ayuda de la cámara clara.

IV.3.3.3.2. Características fisiológicas

A) Capacidad de fermentación de los distintos hidratos de carbono.

Para lo cual hemos empleado los medios descritos en el apartado IV.2.2.3.2.B.

Se siembra incubando posteriormente a 22º C durante 10 días, observando diariamente la capacidad fermentadora de los distintos azúcares, se pone en evidencia por la aparición de burbujas dentro de la campana de Dürham.

Los hidratos de carbono ensayados son: Glucosa, Galactosa, Sacarosa, Maltosa, Lactosa, Rafinosa, Melibiosa, Threalosa, Celulosa, Melizitosa, Inulina, Alfa-metil-glucosido.

B) Asimilación de hidratos de carbono.

Para esta prueba empleamos el medio base de nitrógeno, des--

crito en el apartado IV.2.2.3.2.C.

Partiendo de un cultivo reciente de la levadura en estudio rejuvenecida en extracto de malta, se prepara una suspensión concentrada en agua destilada esteril, se mezcla la suspensión con el medio que mantenemos fundido al baño maria a 45º C; se agita homogeneizando bien la suspensión de la levadura con el medio y se vierte en una placa esteril de Petri.

Se deja enfriar y después de secar el vapor de agua de la placa se disponen sobre la superficie del medio los distintos Hidratos de Carbono que se quieren ensayar.

No poniendo mas de 4 azúcares por placa, en puntos diametralmente opuestos, con el fin de que los resultados no se solapen. La glucosa que nos va a servir de patrón la ponemos en todas las placas.

Posteriormente se incuban a 22º C durante tres semanas, haciendo lecturas diarias. En el momento que vemos que la zona donde hemos puesto un hidrato de carbono hay crecimiento, daremos como positivo la asimilación de éste.

C) Asimilación de compuestos nitrogenados.

El medio utilizado ha sido el medio base con carbono descrito en el apartado IV.2.2.3.2.D.

La metodología seguida es muy similar a la que se ha descrito para la asimilación de compuestos de carbono, pero en este caso - la suspensión en agua destilada tiene que ser muy poco densa, ya que las levaduras tienen capacidad de utilizar sus propios constituyentes como fuente nitrogenada y nos darían resultados erróneos.

Los compuestos que hemos ensayado han sido: Nitrito potásico y Nitrato potásico. Utilizando como patrón Peptona.

D) Pruebas complementarias.

En algunos casos también se han considerado otras características fisiológicas, como son:

- Hidrólisis de la arbutina.
- Capacidad de crecimiento en medios carentes de vitaminas.
- Capacidad de crecimiento en medios que contengan glucosa al 5%.
- Crecimiento a 37º C.
- Capacidad de crecimiento en medios que contengan glucosa al 60%.
- Producción de almidón extracelular.
- Capacidad de hidrolizar la urea.
- Capacidad de formar compuestos carotenoides.
- Capacidad de hidrolizar las grasas.
- Producción de esteres.
- Capacidad de licuar la gelatina.
- Tolerancia al ClNa.

IV.3.3.3.3. Características de reproducción

A) Estas características se ponen de manifiesto por la presencia de ascosporas y ascos, que se pueden evidenciar con el -

crecimiento en extracto de Malta o bien por el método de los microcultivos, incubando de 2 a 3 días a 22º C.

B) Estudio de la capacidad de formación de esporas.

Para el estudio de esta característica empleamos los 4 medios de cultivo descritos en el apartado IV.2.2.3.3.A.

Se siembra la cepa en los cuatro medios, incubando a 22º C, se va observando por medio de preparaciones sucesivas hasta los 30 días. Si en este tiempo no ha esporulado en ninguno de los medios, se considera como no capaz de formar esporas.

IV.3.4. METODOS DE CONSERVACION DE CULTIVOS PUROS

IV.3.4.1. Por resiembras sucesivas en Agar Malta al 3%.

IV.3.4.2. Por liofilización.

Según la técnica convencional de deshidratación por congelación y sublimación al vacío.

IV.3.5. METODOS PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS

IV.3.5.1. METODO PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR LAS POSIBLES CEPAS TOXICOGENICAS EN TRIGO HUMEDECIDO

Las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* aisladas del yogur en estudio, fueron sembradas en trigo molido citado en el apartado IV.2.2.4. para determinar su posible capacidad toxigénica.

El método que utilizamos para este estudio está basado en la

técnica de Gimeno Ciriano (1979).

A) Extracción y limpieza.

a) Se pesan 35 gramos del medio ya citado en el que habíamos sembrado la cepa a estudiar.

b) A los 35 gramos se añaden 90 ml de acetonitrilo y 10 ml de ClK, esta mezcla se agita vigorosamente durante 30 minutos en el agitador de vaivén.

c) Se filtra el extracto a través de un papel de filtro Whatman 40, procurando reducir las pérdidas por evaporación del solvente y se toman 35 ml del filtrado.

d) En un embudo separador, a los 35 ml del filtrado se le añaden 50 ml de isooctano, se agita, se deja separar las dos fases y se decanta la capa superior de isooctano. Se repite el lavado con tres porciones de 50 ml de isooctano en cada lavado. De esta forma eliminaremos los lípidos incluidos entre los compuestos de la muestra.

e) A la fase de acetonitrilo se le añade 12,5 ml de agua destilada y se agita, añadiendo después 25 ml de cloroformo, se vuelve a agitar y se deja separar las dos fracciones. En la fase acuosa eliminamos las sustancias solubles en agua.

f) Se filtra la parte inferior de acetonitrilo-cloroformo a través de un papel de filtro Whatman con sulfato sódico anhidro, recogiendo el filtrado en un matraz piriforme.

g) A la capa acuosa se le añade 1 ml de ClH 1 N, se agita y se añaden 20 ml de cloroformo, se agita y se deja separar las capas. Se filtra la capa inferior clorofórmica por el papel de filtro con sulfato sódico anhidro, junto con el filtrado anterior.

1) El matraz o ampolla piriforme se llevó al rotavapor, evaporando hasta unos 0,2 ml con vacío y a 50-55° C. A continuación se añadió cloroformo hasta la división de 1 ml situada en la parte estrecha y graduada del matraz. Se llevó al agitador de tubos redisolviendo y homogeneizando la solución. A este extracto se le llamó extracto A y se pasó a un minivial.

B) Operaciones generales en la placa de cromatografía en capa fina.

Con un peine trazador (divisor de placas) se dividieron las cromatoplas en 20 franjas de 1 cm de ancho cada una. Se las activó calentando a 110° C por espacio de 30 minutos en estufa, colocándolas en posición vertical. Se guardaron en la cámara de desecación, hasta el momento de su uso en el que deben estar a temperatura ambiente.

En una línea imaginaria situada a 4 cm de la base de la placa, se colocan los siguientes spots a intervalos de 1 cm, dos de 3 microlitros y dos de 6 microlitros de muestra del extracto de solución A. En uno de los spots correspondientes a 3 y 6 microlitros se superpuso 5 microlitros de las soluciones estándar de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (estándar externo).

En la cromatoplasa se trazó una línea transversal que indica la lectura hasta donde debe llegar el solvente de desarrollo, dicha altura fue de 11,5 cm contando a partir de la línea imaginaria.

C) Operaciones generales de desarrollo en las cromatoplasas de capa fina.

Las cromatoplasas se colocaron en las cámaras de separación cromatográfica, en posición vertical, previamente se depositó 200 ml del solvente de desarrollo, ya descrito en el apartado --

IV.1.2.2., se tapó y desarrolló hasta que el frente de solvente alcanzó la altura indicada.

Después se saca la cromatoplaça y se deja secar al aire.

D) Interpretación de las cromatoplaças desarrolladas.

Una vez realizadas las operaciones del apartado anterior, se examinaron las cromatoplaças a la U.V. de 366 nm y de 254 nm.

A 366 y 254:

- Aflatoxina B₁: spot con fluorescencia azul,
- Aflatoxina B₂: spot con fluorescencia azul.
- Aflatoxina G₁: spot con fluorescencia verde.
- Aflatoxina G₂: spot con fluorescencia verde.

El orden de aparición en la cromatoplaça de menor a mayor Rf es: Aflatoxina G₂, G₁, B₂ y B₁.

E) Pruebas de reconfirmación de las aflatoxinas.

Cuando determinamos la posible existencia de aflatoxinas en una cromatoplaça, realizamos unas pruebas de confirmación.

En primer lugar pulverizamos la cromatoplaça con una solución de ácido sulfúrico/agua (1v/3v) y se observó a la luz U.V. de 366 nm y de 254 nm. Apareciendo las cuatro aflatoxinas con una fluorescencia amarilla.

Para la confirmación de aflatoxinas B₁ y G₁ seguimos el método de W. Przbylski (1975), que transforma las aflatoxinas B₁ y G₁,

por medio del ácido trifluoroacético en B_{2a} y G_{2a} .

Se seleccionan dos zonas de una cromatoplaça (zona A y zona-B). La muestra se coloca de la manera mencionada anteriormente; en la zona B se superpone en cada uno de los spot 1 microlitro de ácido trifluoroacético, dejando reaccionar 5 minutos, protegiendo esta zona de la luz. Se seca la placa y se lleva a desarrollar como se menciona en la técnica.

Se observa a la luz U.V. de 366 nm comparando la zona A con la zona B. En la zona A los problemas y standars internos y externos se encontrarán en la forma y orden habitual. En la zona B las aflatoxinas B_2 y G_2 estarán en el mismo R_f a como aparecen en la zona A, pero las aflatoxinas B_1 y G_1 estarán transformadas en B_{2a} y G_{2a} , apareciendo muy cerca de la línea imaginaria en el orden: R_f aflatoxina B_{2a} mayor que R_f aflatoxina G_{2a} . Es de notar que la intensidad de fluorescencia de la aflatoxina B_{2a} y G_{2a} es mayor que la de aflatoxina B_1 y G_1 habituales.

F) Determinación cuantitativa de las aflatoxinas.

Una vez identificadas las aflatoxinas del extracto de solución A de la muestra, se cromatografían una serie de diluciones, determinándose para qué dilución puede comprobarse todavía la sustancia. Del límite inferior de detección de comprobación y del factor de dilución se puede calcular la cantidad de aflatoxina en cuestión.

La técnica a seguir es:

En una cromatoplaça depositar: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 microlitros de la solución A, problema de trabajo y un spot aparte de aflatoxina pura que será el standar externo.

Desarrollar e identificar. Supongamos que la aflatoxina se ve

solo en algún spot y en algún otro ya no es visible, se fija el -
volumen último del spot que se ve por observación a la luz U.V.
de 366 nm y después de pulverizar con la solución de ácido sulfú-
rico 1/3 observamos a la luz U.V. de 366 nm.

Una vez determinado este volumen último del spot visible de -
aflatoxina y utilizando el límite de detección de aflatoxina se
procede a dos cálculos cuyo resultado debe ser similar: de ellos,
empleando el volumen del último spot que se ve solo a la luz de
366 nm y el otro cálculo, empleando el último volumen de spot que
se ve después de pulverizar con la solución de ácido sulfúrico y
observar a la luz U.V.

En el caso de que la aflatoxina se vea en todos los spots, se
toman 50 microlitros de la muestra solución A y se llevan a un mi-
nivial añadiendo 250 microlitros de cloroformo, a este nuevo ex-
tracto lo llamamos solución B.

En una cromatoplaque se depositan: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9,10
de la solución B y un spot aparte de aflatoxina pura que será el
standard externo. Desarrollar e identificar. Se procederá como -
anteriormente multiplicando el resultado del cálculo por 6.

Si se ven todos los spots se toman 50 microlitros de la solu-
ción B llevándolos a un minivial con 250 microlitros de clorofor-
mo, de esta forma conseguimos el extracto solución C.

Realizando en una cromatoplaque el proceso normal ya descrito,
el resultado se multiplica por 36; y así sucesivamente con la mis-
ma secuencia de dilución y la misma secuencia de factor de cálcu-
lo que se deduce de lo anterior, hasta conseguir el cálculo de -
los microgramos de aflatoxina por Kg de producto o partes por bi-
llón.

G) Determinación del límite de detección de aflatoxinas.

Se elaboran una serie de diluciones de la aflatoxina determinándose el límite inferior de comprobación por medio de la cromatografía en capa fina y el correspondiente tipo de revelado.

Se toman con microjeringa 200 microlitros de patrón inicial de aflatoxina, cuya concentración es 0,005 microgramos por microlitro, llevándose al interior de un matraz aforado topacio de 10 ml. Se enrasa a volumen con Benceno/Acetonitrilo 98/2, se tapa y se agita. La concentración final es de 0,0001 microgramo por microlitro.

Se depositan en una cromatoplaaca: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 20 microlitros del patrón diluido que corresponden a 0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,0004, 0,0005, 0,0006, 0,0007, 0,0008, 0,0009, 0,001 y 0,002 microgramos de aflatoxina.

Se desarrolla en cloroformo/acetona 88/12 y después se identifica fijando el límite de detección encontrado: observando sólo a la luz de 366 nm y pulverizando con ácido sulfúrico 1/3 y observando a 366 nm.

IV.3.5.2. METODO PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN EL YOGUR PRODUCIDAS POR CEPAS TOXICOGENICAS

Las cepas confirmadas como productoras de aflatoxinas en trigo, fueron inoculadas en yogures de distintos tipos, para determinar su posible producción en este sustrato.

El método que se utilizó para este estudio está basado en la técnica de Schuller (1973).

A) Extracción y limpieza.

a) Se mezclan 25 cc de yogur con 25 ml de acetona.



b) La masa obtenida se pasa a la columna de cromatografía - preparada con 50 gramos de celite lavado con ácido.

c) Se diluye la columna con 200 cc de cloroformo.

d) Retener esta fracción y evaporar por secación.

e) Se disuelve el residuo en 50 ml de metanol y 40 ml de N-pentano.

f) Se pasa la solución a un embudo separador que contiene - 75 ml de agua destilada y 2 gramos de ClNa.

g) Agitar y vaciar el agua en un segundo embudo separador y extraer otra vez con 50 ml de N-pentano.

h) Se rechaza el pentano y se extrae el agua con 4 porciones de 25 ml de cloroformo.

i) Se evapora el extracto combinado mediante rotavapor y se disuelve el residuo en 100 microlitros de cloroformo. Pasándolo a continuación a un minivial.

El resto de las operaciones realizadas en esta técnica a - partir de la extracción y limpieza, son las mismas que las ya - descritas en el apartado IV.3.5.1., puntos B, C, D, E, F, G.

IV.3.6. METODOS ESTADISTICOS

IV.3.6.1. Estudio de la significación de la diferencia del crecimiento en las situaciones inicial y final: Prueba del χ^2

El objeto de este estudio, ha sido determinar las diferencias significativas en cuanto al grado de contaminación de los yogures en estudio, dependiendo que éstos fueran analizados recién elaborados o el día de su caducidad.

Para realizar este estudio se ha utilizado la prueba del χ^2 , según se describe a continuación:

Una medida de la discrepancia existente entre las frecuencias observadas y esperadas es suministrada por el dato estadístico χ^2 dado por

$$\chi^2 = \frac{(o_1 - e_1)^2}{e_1} + \frac{(o_2 - e_2)^2}{e_2} + \dots + \frac{(o_k - e_k)^2}{e_k} + \frac{(o_j - e_j)^2}{e_j}$$

donde si el total de frecuencias es N

$$\sum o_j = \sum e_j = N$$

pudiendo utilizarse la expresión equivalente

$$\chi^2 = \sum \frac{o_j^2}{e_j} = N$$

De la tabla de contingencia calculamos el correspondiente χ^2 . A continuación comparamos ésta con el valor dado en tablas estadísticas. Si el valor calculado de χ^2 está por debajo de un valor crítico dado en la tabla, entonces aceptamos la hipótesis de que las situaciones no se encuentran relacionadas, pero si los valores están por encima del valor crítico, rechazamos la hipótesis; en el último caso podemos sospechar que no hay diferencias significativas.

El valor que toma chi-cuadrado mide, aproximadamente, como los valores observados difieren de los valores esperados. Así, si $\chi^2 = 0$, las frecuencias observadas y teóricas concuerdan exactamente mientras que si χ^2 es mayor que 0 no coinciden exactamente. A valores mayores de χ^2 , mayores son las discrepancias entre las frecuencias observadas y esperadas.

Podemos así mismo aplicar fórmulas sencillas para el cálculo de χ^2 , que se basan únicamente en las frecuencias observadas:

	PRESENCIA	AUSENCIA	TOTALES
INICIALES	A	B	A + B
FINALES	C	D	C + D
TOTALES	A + C	B + D	N=A+B+C+D

Así en el caso de una tabla de contingencia 2 x 2 :

$$\chi^2 = \frac{N (A \cdot D - B \cdot C)^2}{(A + C) (B + D) (A + B) (C + D)} =$$

$$= \frac{N E^2}{(A + C) (B + D) (A + B) (C + D)}$$

Siendo $E = A.D - B.C$

IV.3.6.2. Análisis de componentes principales

Consiste en transformar un conjunto variable $x_1, x_2, \dots x_p$, en un nuevo conjunto $y_1, y_2, \dots y_p$, con las siguientes propiedades:

a) Cada y es una combinación lineal de las x , o sea:

$$y_1 = a_{11} x_1 + a_{12} x_2 + \dots + a_{1p} x_p$$

b) La suma de los cuadrados de los coeficientes a_{ij} es la unidad, es decir:

$$\sum_{j=1}^p a_{ij}^2 = 1$$

c) De todas las combinaciones posibles de este tipo, y_1 es la que tiene mayor varianza.

d) De todas las combinaciones posibles de este tipo no correlacionadas con y_1 , es y_2 la que tiene mayor varianza. Análogamente, y_3 tiene la mayor varianza de todas las combinaciones no correlacionadas con y_1 e y_2 . Y así sucesivamente hasta que el conjunto de las y ha sido completamente definido.

De esta forma se define un nuevo conjunto de p variables, no correlacionadas entre sí, y colocadas por orden de varianza decreciente. La idea subyacente en el método es que unas pocas componentes posean la mayor parte de la varianza total de los distintos géneros, con lo cual puede representarse en diagramas planos o tridimensionales. Es importante señalar aquí que la característica que hace quizás más útil a este análisis en taxonomía numérica, e incluso en otras aplicaciones, es que, en general, cada eje tiene un significado, esto es, estudiando las componentes de los vectores propios (direcciones de cada eje) puede establecerse cuáles han sido las variables que mas han contribuido a conseguir la separación mostrada por el eje en cuestión. Estas variables son aquéllas para las cuales la componente correspondiente es mayor en valor absoluto.

V. RESULTADOS

V.1. MICOFLORA DEL YOGUR

V.1.1. Relación de géneros encontrados en nuestro estudio

Basándonos en la clasificación que establece Von Arx ---
(1981) para mohos y la que adopta Lodder (1974) para levaduras,
la relación de géneros encontrados en el presente estudio es la
que sigue:

CLASE ZYGOMYCETES: O. MUCORALES

géneros:

Circinella
Rhizopus
Mycotypha
Cunninghamella

CLASE DEUTEROMYCETES: O. SPHAEROSIDALES

géneros:

Phoma

O. MELANCONIALES

géneros:

Epicoccum

O. MONILIALES

géneros:

Geotrichum
Acremonium
Fusarium
Apahnocladium
Aspergillus
Penicillium
Paecilomyces
Monodictys
Monilia
Cladosporium
Aureobasidium
Botrytis
Alternaria
Stemphylium
Curvularia
Ulocladium
Veronaea

O. MICELIA STERILIA

Dentro de las levaduras los géneros que se han encontrado -
con mayor frecuencia son:

Sporobolomyces
Torulopsis
Rhodotorula.

V.1.2. Taxonomía aplicada

Para la identificación de los distintos géneros encontrados en el presente estudio, como ya se ha dicho, se ha utilizado el libro de Von Arx (1981) como texto básico, consultando otros tratados en la determinación de algunos grupos, así por ejemplo, en el caso de O. Sphaerosidales ha sido el libro de Barnett (1972), la identificación de levaduras se ha basado en los criterios seguidos por Lodder (1974). También se ha consultado en algunos casos el tratado de Ainsworth (1965-1973), que consta de cinco tomos. Los textos de Barrons (1977) Domsch (1972) y para la determinación de algunos Dematiaceos se ha tenido en cuenta los textos de Ellis (1976).

Así mismo, también se consultó la reciente revisión taxonómica de Mc.Ginnis (1980), sobre los hongos con interés en medicina. No variando la adoptada en este trabajo ya que básicamente no se encuentran muy distantes. sobre todo en lo referente a Dematiaceos.

Con el fin de realizar una revisión general sobre el tema - se consultaron también los siguientes trabajos: Hughes (1953), Cain (1972), Cooke (1974).

Características y descripción de los hongos aislados

La clase Zygomycetes, ya estudiada en el apartado I.3. incluye dos ordenes, Mucorales y Entomophorales.

En el presente estudio, los hongos encontrados a esta clase, se incluyen todos en el orden Mucorales, cuyas características principales son:

. En general son saprofiticos, viviendo sobre sustratos tales como estiercol y sustancias animales y vegetales en descompo

sición. Ocasionalmente pueden parasitar a vegetales, animales e incluso al hombre causando serios problemas.

. El micelio presenta generalmente un desarrollo abundante.

. En la mayoría de las especies, las hifas son cenocíticas, produciéndose septos en las bases de los órganos reproductores, esporangios y gametangios, y ocasionalmente en otras partes del micelio cuando envejece.

. En algunas especies el micelio produce rizoides, formándose especialmente en los puntos donde se pone en contacto con una superficie dura adhiriendo el hongo al sustrato.

. Por la reproducción asexual se producen esporas en esporangios, esporangiolos o merosporangios.

Los géneros encontrados en el presente estudio pertenecientes al O. Mucorales son:

Circinella
Rhizopus
Mycotypha
Cunninghamella

Para llegar a la identificación de estos géneros se ha consultado también la monografía de Zycha (1969) y los trabajos de Hesseltine (1955).

Circinella sp. (Sorokine) Berlese y De Toni

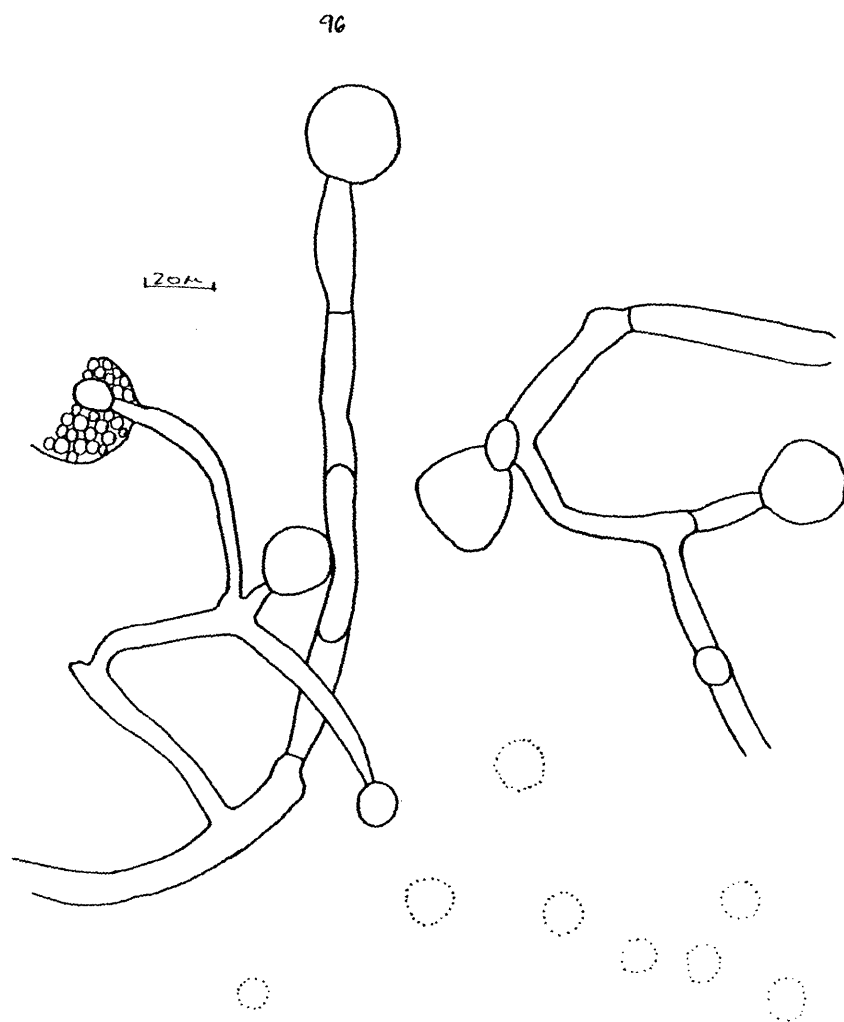
Colonia característica de esta clase.

Hifas con desarrollo normal, cenocíticas. Los caracteres distintivos de este género son:

- . Tener el esporangio esférico y sin apófisis
- . Los esporangioforos están ramificados simpedialmente y con las ramas curvadas, no naciendo en los estolones
- . Los esporangios son semejantes y columnados, teniendo la pared esporangial delgada, las esporas se liberan por el rompimiento de la parte superior de la pared.

Siguiendo la monografía sobre el género de Hessel-tine(1955) se ha identificado la especie aislada en este trabajo como *Circinella muscae*.

96



Circinella muscae (Sorokine)
Berlese y De Toni

Rhizopus sp. Ehrenb. ex Corda

Sus especies tienen amplia difusión en la naturaleza, encontrándose en todo tipo de sustancias y como contaminantes aerógenos.

Tienen un crecimiento abundante y rápido en la mayoría de los medios de cultivo.

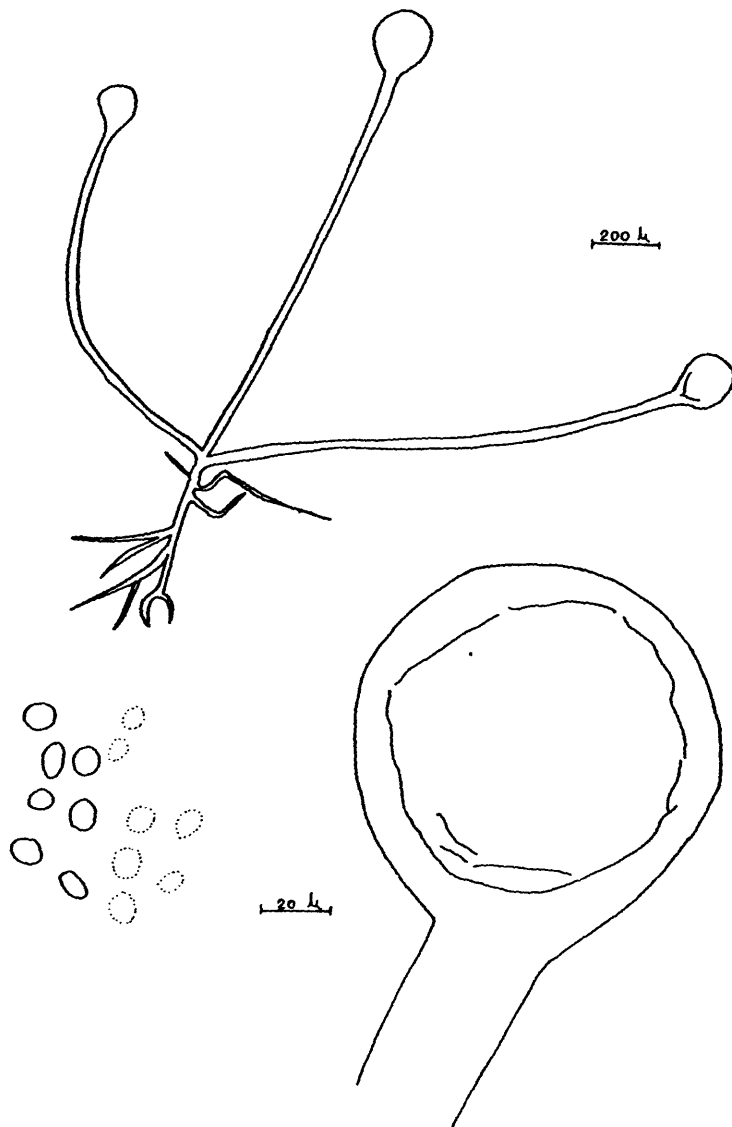
El micelio forma masas algodonadas que tienden a llenar por completo la placa de Petri o el tubo de ensayo, esporulando en la superficie contacto del micelio con el cristal.

Los esporangios tienen columela y también apófisis en forma de embudo, son esféricos o casi esféricos. La pared esporangial es fina, liberándose las esporas al romperse por la parte superior.

Presentan:

- . Estolones de gran tamaño, a veces de varios milímetros
- . Rizoides, que son hifas radicales que nacen en los puntos en los que los estolones contactan con el medio.

Siguiendo el trabajo sobre el género *Rhizopus* de Inui (1965) la especie aislada por nosotros ha sido *Rh. nigricans*.



Rhizopus nigricans Ehrenb.

Mycotypha sp. Fennel

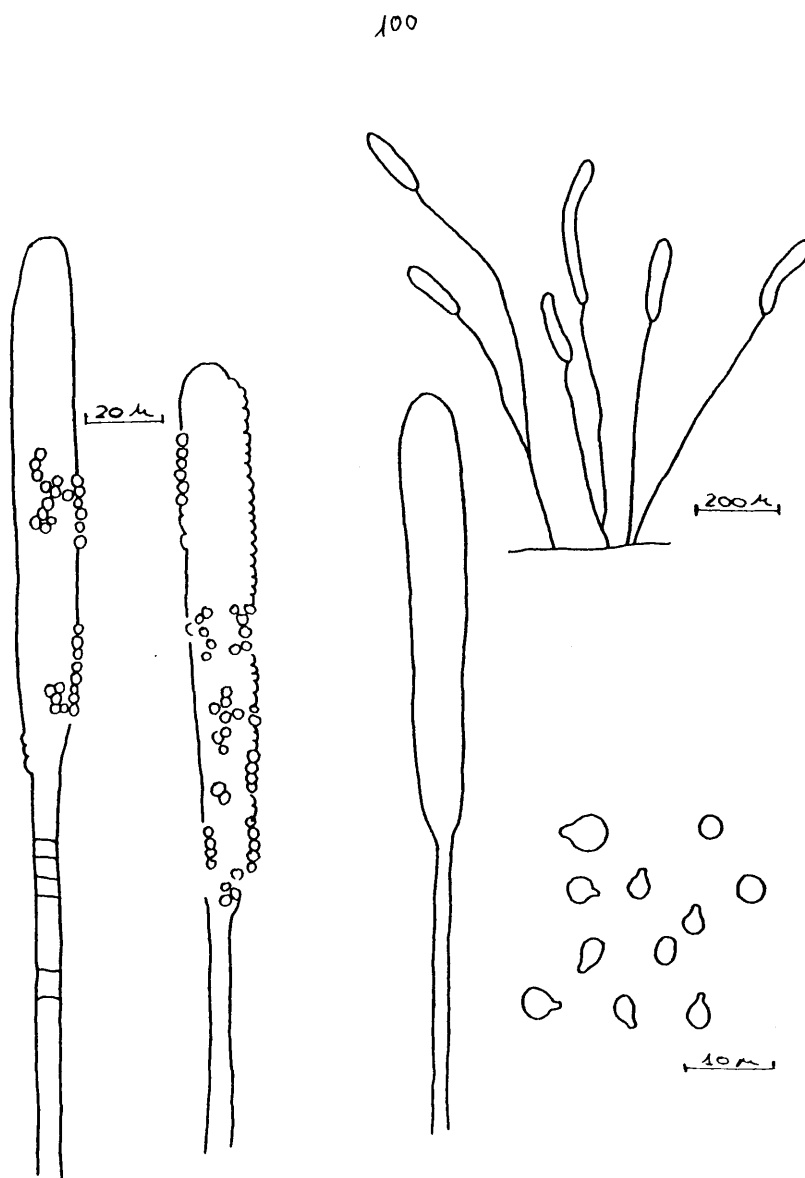
Las colonias son filamentosas de crecimiento reducido, color gris oscuro.

Los esporangioforos son erectos, simples, normalmente cortos, no naciendo en los estolones. Los esporangios en forma de frasco, columnados y sin apófisis. Este es simple teniendo la porción superior ensanchada.

Las esporas nacen del esporangio en hilera dejando cuando se desprende una cicatriz. Estas presentan un apéndice que es por donde están unidas al esporangio.

Las zigosporas nacen de hifas separadas normalmente por un proceso isogámico.

La especie identificada por nosotros ha sido *M. microspora*, siguiendo los criterios de Von Arx (1981).



Mycotypha microspora Fennel

Cunninghamella sp. Matr.

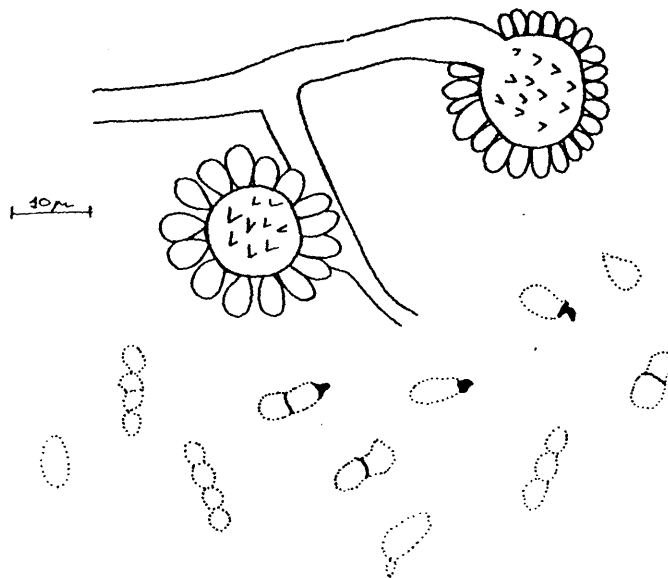
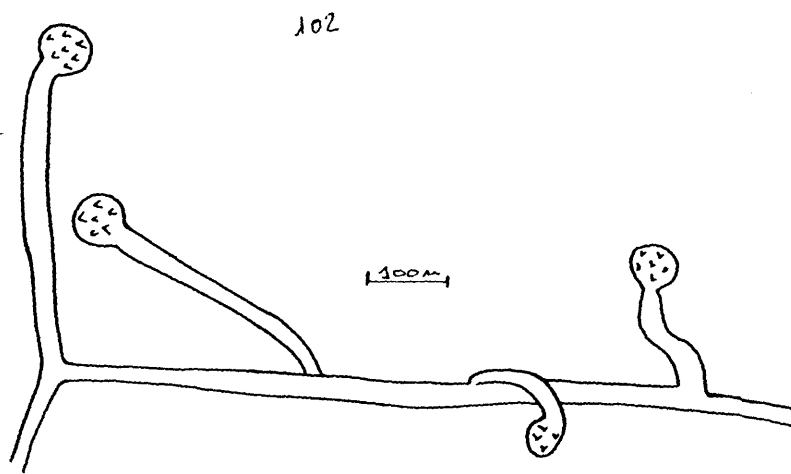
Colonias de amplio crecimiento. Micelio de color blanco, no septado.

Conidioforo simple o ramificado. Con estructuras reproductoras asexuales sobre ellos.

Conidios equinulados o globosos, de una sola célula.

Son homotálicos.

Las zigosporas nacen de hifas separadas normalmente por un proceso isogámico.



Cunninghamella sp. Matr.

Caracteres utilizados en la clasificación de los Deuteromycetes

a.- Tipo de fructificación

b.- Forma, color y tabicamiento de los conidios.

a.- Los tipos de fructificación forman la base para establecer dentro de los Deuteromycetes cuatro ordenes-forma:

- 1) O. Sphaerosidales: forman picnidios
- 2) O. Melanconiales: forman acérvulos
- 3) O. Moniliales: dentro de este orden incluimos a todos los Deuteromycetes que se reproducen de otro modo: por gemación, fragmentación de las hifas en oidios, conidioforos libres, esporo-
doquios o sinemas.
- 4) O. Micelia sterilia: grupo de hongos en los que no se conocen conidios ni otras células reproductoras. En alguno de éstos se ha descubierto su estado perfecto, resultando ser Basidiomycetes. Este grupo es tan heterogéneo que no interesa organizarlos en familias-forma.

O. Sphaerosidales

Este orden lo forman los hongos imperfectos que producen los conidios dentro de cuerpos globosos o en forma de botella, llamados picnidios.

Los conidioforos de los picnidios son muy cortos por lo general o están ausentes, en pocos casos son largos y muy ramificados. Siempre nacen de las células internas de la pared picnidial.

La pared picnidial es pseudoparenquimatosa. Los picnidios pueden estar completamente cerrados o tener un ostiolo (apertura). La variación de la estructura picnidial sirve para delimitar los diversos géneros-forma de los Deuteromycetes con picnidio.

Para la identificación de los géneros-forma pertenecientes a este orden-forma hemos seguido el manual de Barret (1972), identificando el género *Phoma*.

Phoma sp. *Saccardo*

Sus hifas son oscuras, presentando a veces clamidosporas unicelulares o pluricelulares.

Los picnidios son de color oscuro de forma globosa u ovoide, estando algo aplastados.

Tienen ostiolos.

Los conidioforos apenas son visibles.

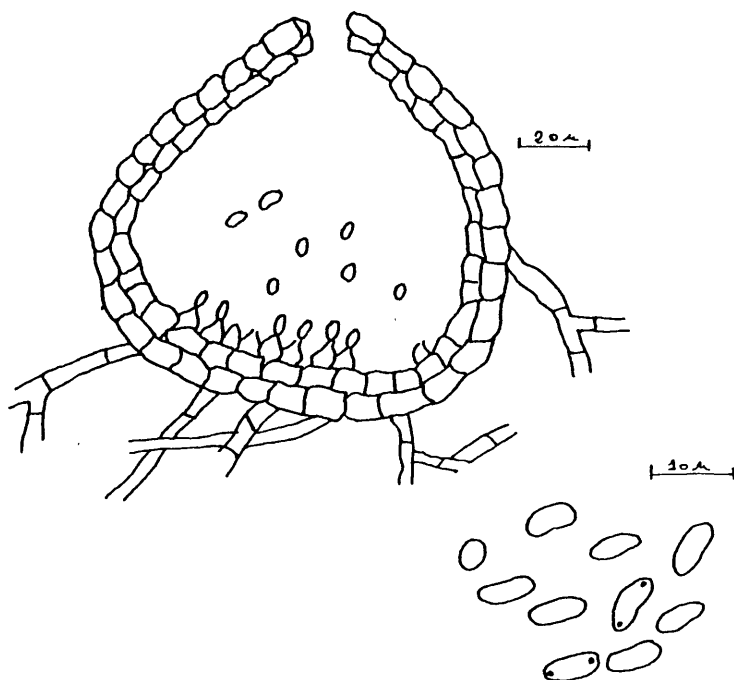
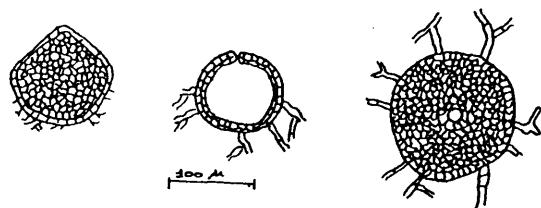
Los conidios son hialinos, unicelulares y ovoides.

- 105 -

Su habitat normal es el suelo o bien como parásitos de vegetales.

La especie identificada por nosotros ha sido *Ph. herbarum*, siguiendo los criterios de Barnett (1972).

106



Phoma herbarum Saccardo

O. Melanconiales

Todos los Melanconiales pertenecen a la familia-forma Melanconiaceae.

Muchos son parásitos de plantas, causando un grupo de enfermedades llamado antracnosis.

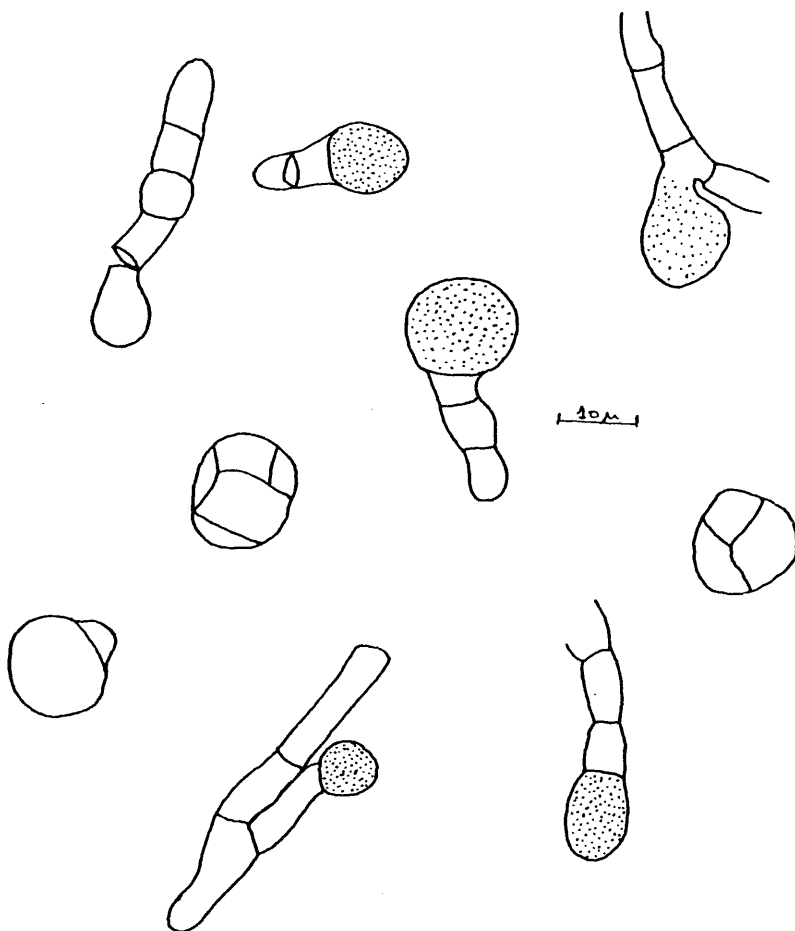
Los acérvulos, que son las estructuras características de este grupo, generalmente se desarrollan debajo de la cutícula o debajo de la epidermis del hospedador, haciéndose eruptivas cuando maduran.

Perteneciendo a este orden hemos identificado un género: -
Epicoccum.

Epicoccum sp. Link ex Fr.

Sus conidias son pigmentadas, normalmente oscuras, truncadas en la base y a menudo multiseptadas, con tabiques longitudinales y transversales. Este tipo de conidia recibe el nombre de dictyospora. Su forma es esférica o ampliamente claviforme, presentando una superficie verrugosa..

La especie aislada por nosotros ha sido *E. nigrum* siguiendo los criterios de Von Arx (1981).



Epicoccum nigrum Link

O. Moniliales

Constituye el orden-forma mas amplio dentro de Deuteromyces, contando con mas de diez mil especies. Es de gran importancia para el hombre, ya que incluye gran cantidad de especies patógenas al organismo humano, animales y plantas, además de pertenecer a este grupo hongos de gran interés industrial.

Von Arx (1981), basándose en el tipo de conidias que forman, lo divide en diferentes grupos que pasamos a detallar.

El primer grupo que establece es el formado por los géneros en los que el micelio presenta conexiones laterales o son parecidos a Basidiomycetes; dentro de este grupo incluye al género *Sporobolomyces*, aislado en nuestro trabajo, pero al que por razones prácticas, siguiendo el criterio de Lodder (1974) para su identificación, hemos incluido dentro de las levaduras, las cuales serán tratadas mas adelante.

El segundo grupo lo constituyen los géneros que forman artrosporas.

En el presente estudio, el género que hemos identificado perteneciente a este grupo es el género *Geotrichum*.

Geotrichum sp. Link ex Pers.

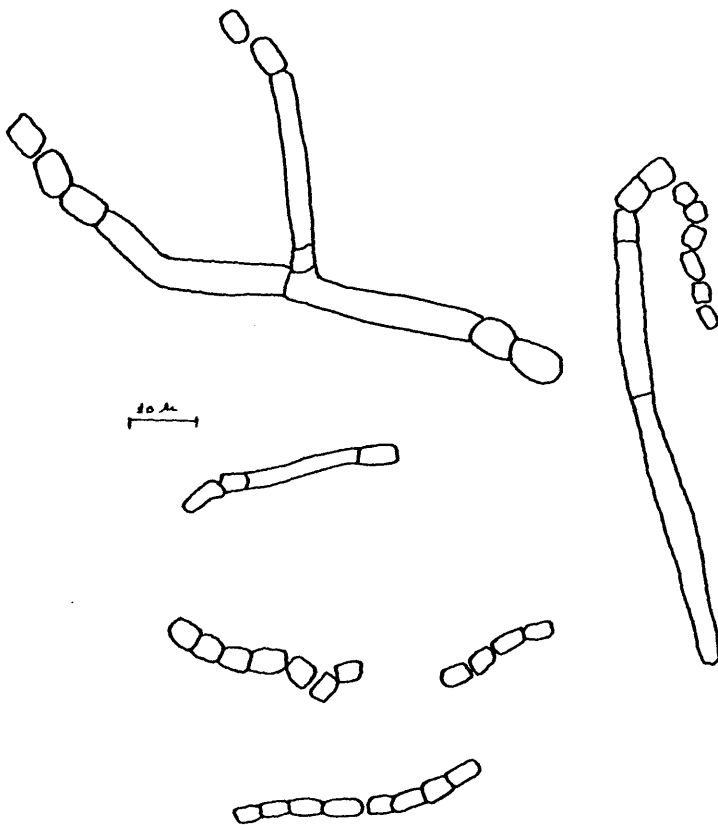
Es un hongo dimórfico. Sus colonias son blancas o de colores claros, pudiendo presentar aspecto levaduriforme o micelial, con un micelio aereo normalmente limitado.

La principal característica del género es que el micelio se fragmenta por completo, en trozos pequeños unicelulares de

forma mas o menos cilíndrica, que son las llamadas artrosporas.

Carece de conidioforos.

La especie identificada por nosotros ha sido *G. candidum*, siguiendo los criterios de Von Arx (1981).



Geotrichum candidum Link ex Pers.



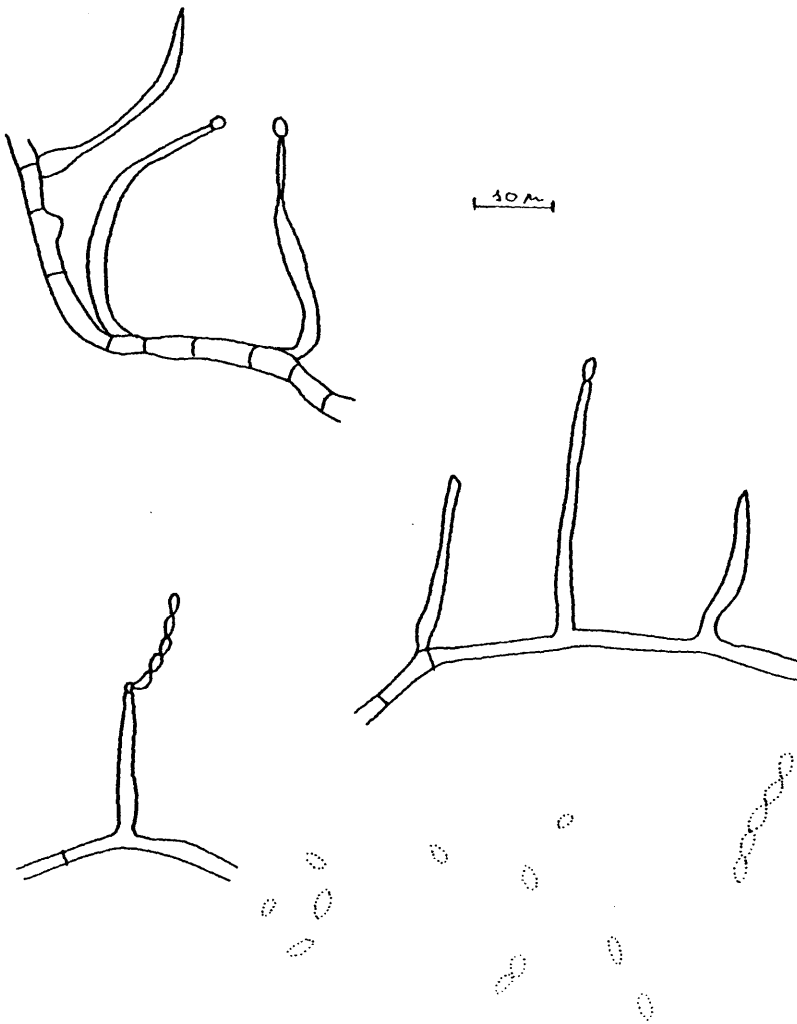
Acremonium sp. Link ex Fr.

Las colonias son normalmente blancas o de colores pálidos, por lo general algo viscosas.

Presentan fialides alargadas mas anchas cerca de la base, con forma de frasco. Estas arrancan, en forma de ramas, de todos los puntos de las hifas rastreras. Estas fialides se afilan gradualmente en el extremo, separándose sucesivamente los conidios que por una segregación de un líquido viscoso quedarán reunidos en masas. También pueden formar cadenas. Estos conidios son unicelulares.

La especie aislada por nosotros ha sido *A. roseolum*.

113



Acremonium roseolum Link exFr.

Fusarium sp. Link ex Fr.

Las fialides son simples, naciendo de las hifas en posición lateral, terminal o bien reuniéndose en grupos terminales ramas de conidioforos cortos, por lo que parecen esporodiquios.

El carácter común a todas las especies del género, y a la vez el que los distingue de otros, es la forma y características de las macroconidias, pluricelulares, hialinas, ligeramente arqueadas o faciliformes, subcilíndricas o fusoides, de extremos puntiagudos y pediformes en la base; los septos son transversales, incoloros o de color pálido, nunca oscuros.

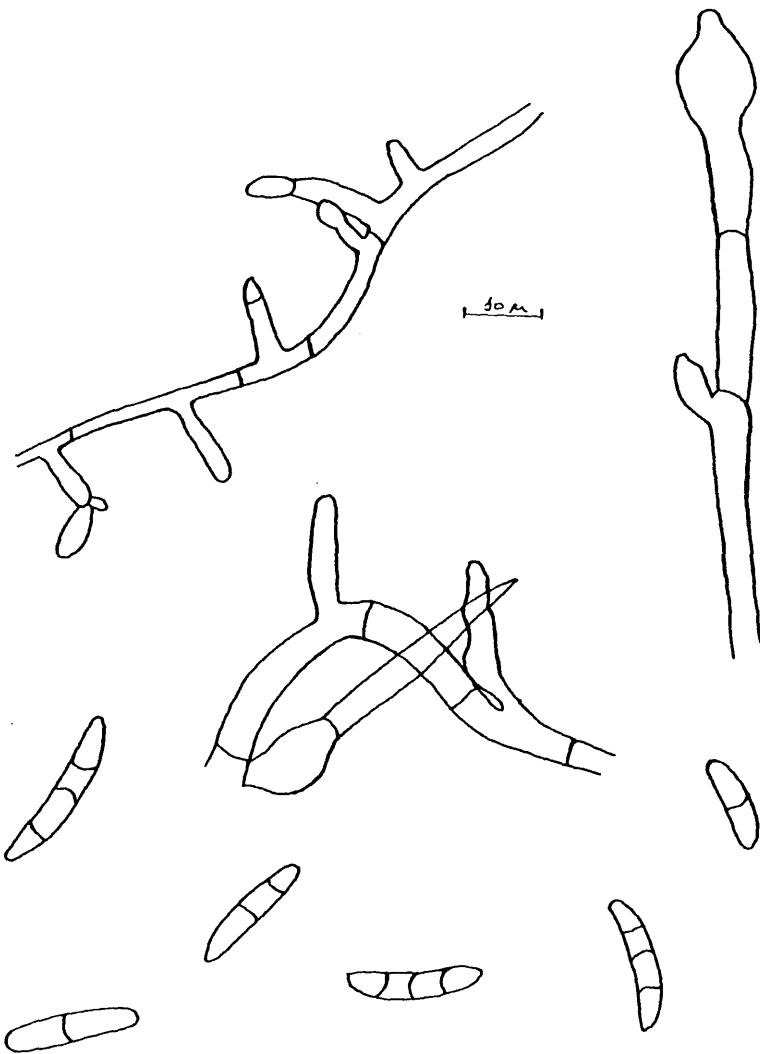
Además de las macroconidias, muchas especies producen microconidias, que son generalmente unicelulares, aunque a veces pueden tener dos o tres células. Son hialinas y de forma fusoides o ligeramente curvada.

También pueden formar clamidosporas unicelulares y bicelulares, terminales o intercalares, formándose en el micelio o en las macroconidias.

Para la identificación de las especies de este género, son caracteres a considerar: la forma de los macroconidios, el tamaño y el número de septos. También presentan interés taxonómico la presencia o ausencia de microconidias y de clamidosporas.

Un trabajo consultado sobre dicho género es el de Booth, (1971).

115



Fusarium sp. Link ex Fr.

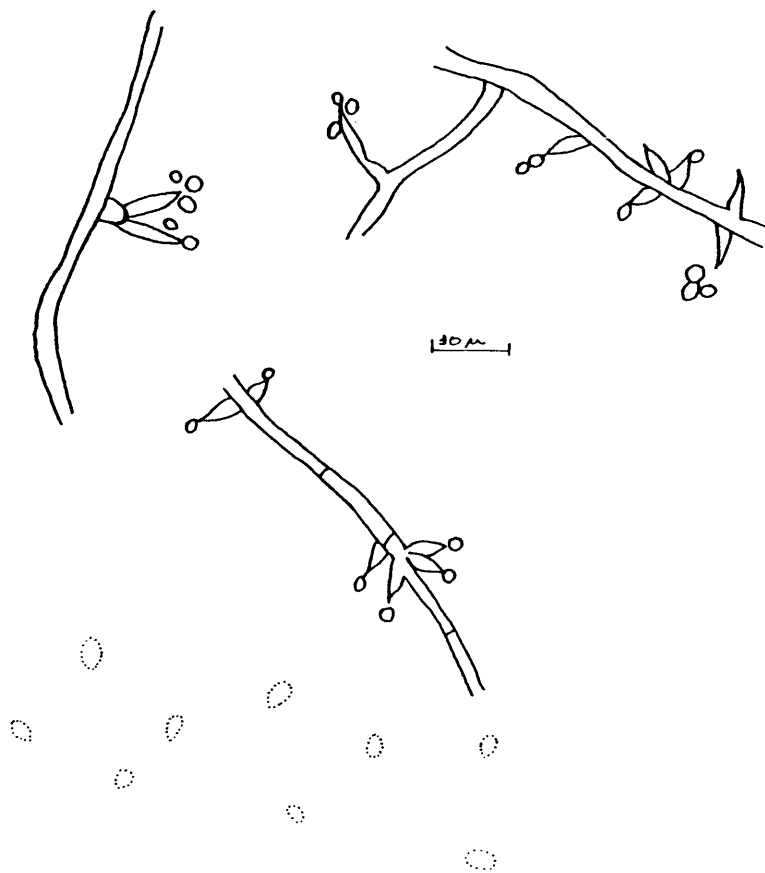
Aphanocladium sp. W. Gams

Colonias lanosas, blancas.

Fialides usualmente reducidas a esterigmas formando un conidio simple.

La especie aislada por nosotros, siguiendo los criterios de Von ARx (1981) ha sido *A. album*.

117



11

Aphanocladium album W. Goms

Aspergillus sp. Mich. ex Fr.

Las colonias según las especies presentan una gama muy amplia de coloraciones y de formas.

El micelio: su coloración puede ir de incolora a tomar colores pálidos, brillantes o bien formando concreciones superficiales de materias colorantes.

Sus hifas son septales tanto en la parte sumergida como en la aérea.

Las ramas fértiles, llamadas pedúnculos, se originan en células miceliares de pared gruesa, denominadas células basales; los pedúnculos sales mas o menos perpendiculares a las células basales.

La pared de los pedúnculos puede ser lisa o rugosa; éstos acaban en un engrosamiento (vesícula) que toma distintas formas según la especie, pudiendo ser globosa, redonda, claviforme hemisférica o ser simplemente un pequeño engrosamiento del pedúnculo.

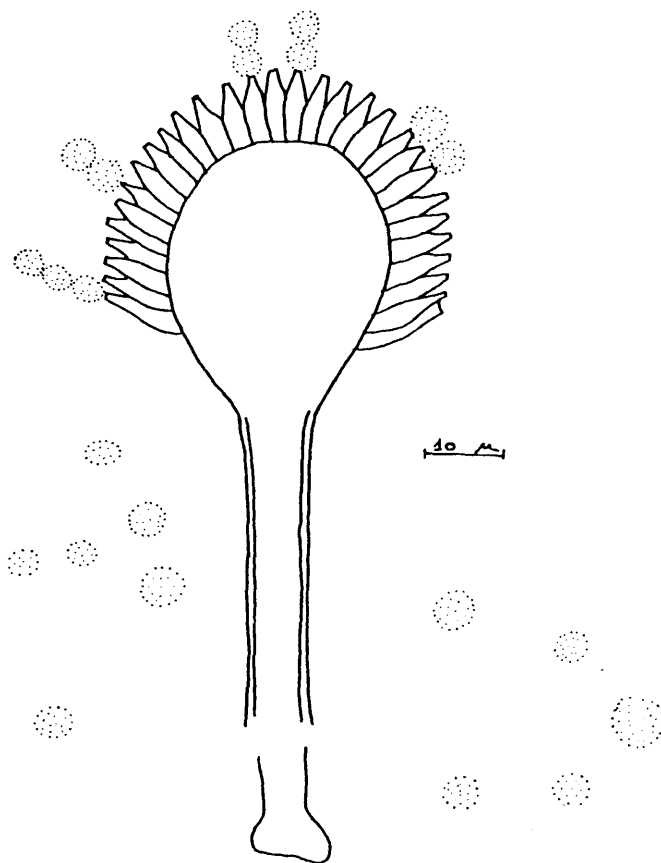
En el caso de los *Aspergillus* uniseriados, la vesícula lleva en toda su superficie o en la parte superior, a partir de una determinada altura, una serie de fialides. Y en el caso de los *Aspergillus* biseriados, llevan sobre la vesícula unas células intermedias que son mas o menos cilíndricas, llamadas metulas, y sobre ellas las fialides. Tanto las fialides como las metulas proceden de la superficie de la vesícula.

Los conidios se segregan uno tras otro de los ápices de las fialides, formando cadenas no ramificadas. Algunas especies producen peritecios de interés taxonómico. Otras forman esclerotios, de menos interés taxonómico.

Para la identificación de las distintas especies de este género hemos seguido las monografías de Raper y Thom (1965).

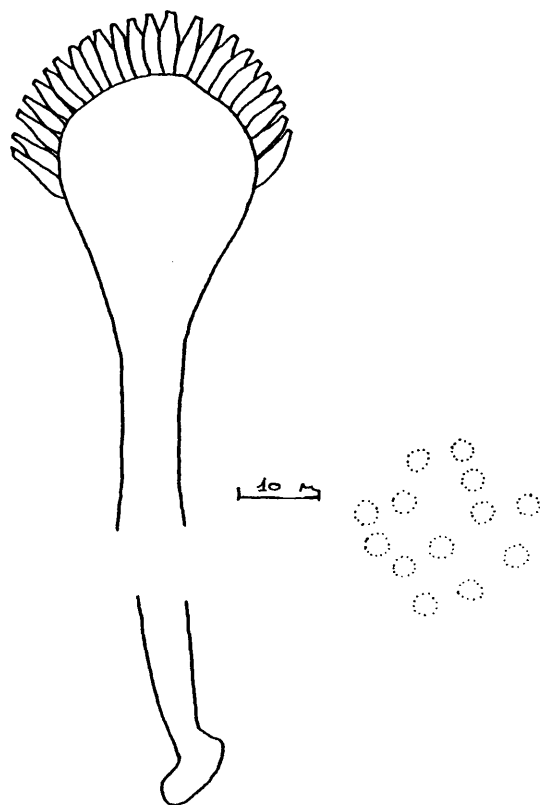
Las especies aisladas son: *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. aculeatus*, *A. clavatus*.

120

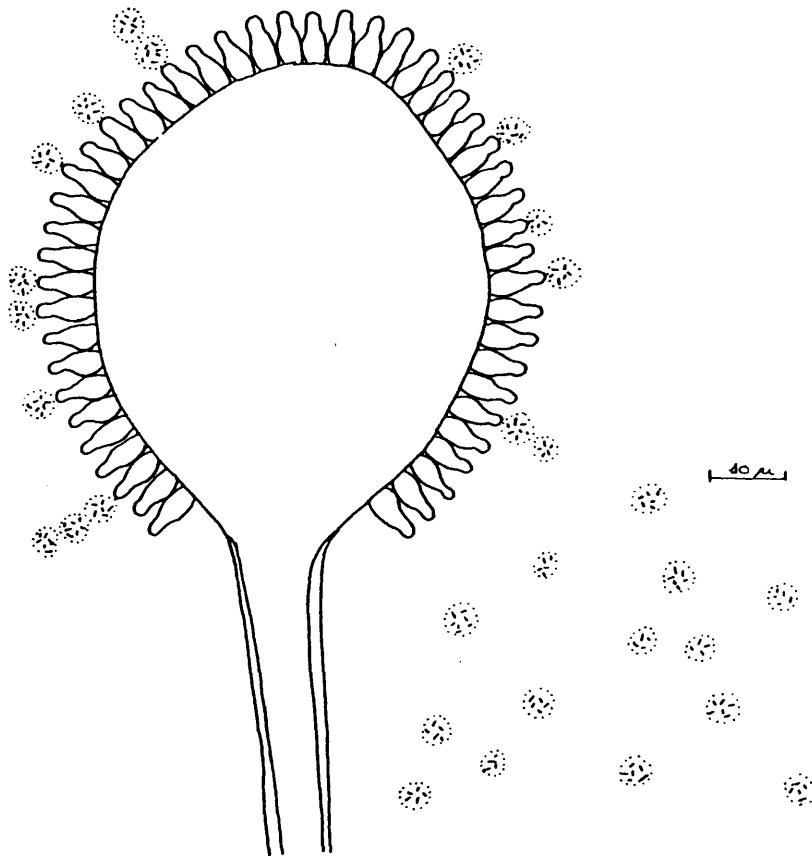


Aspergillus parasiticus Speare

121

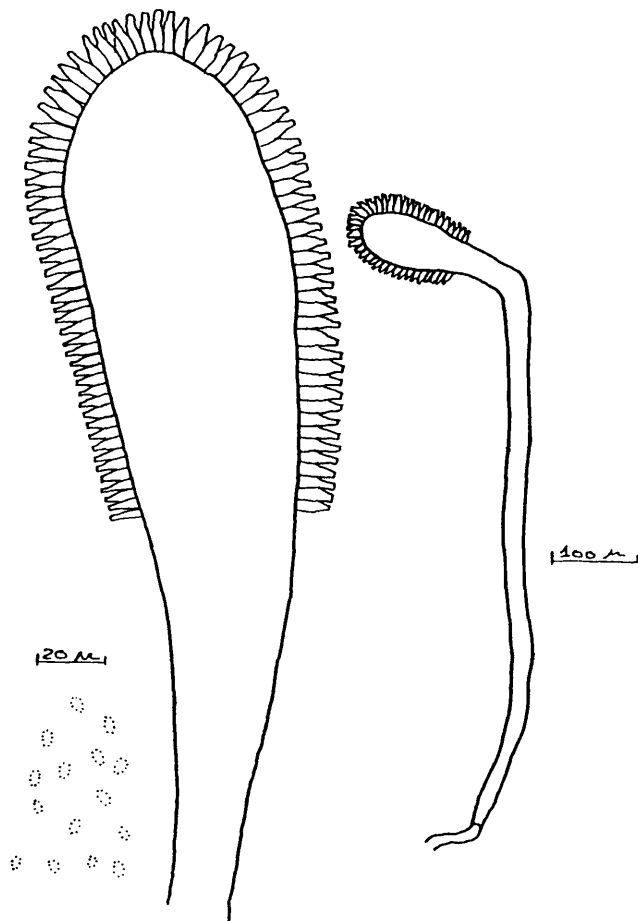


Aspergillus fumigatus Fresenius



Aspergillus aculeatus Iizuka

123



Aspergillus clavatus Desmazieres

Penicillium sp. Link ex Fr.

Las colonias suelen ser verdoas, pudiendo presentar otras tonalidades.

El micelio vegetativo puede ser incoloro o en colores pálidos o brillantes pero nunca oscuros. Es tabicado en la parte sumergida y en la parte aérea. La porción aérea puede estar muy enmarañada, o sueltamente flocosa, o formando cordones con las hifas.

Las hifas fértiles arrancan del micelio sumergido en posición mas o menos perpendicular al mismo, pudiendo estar sueltas entre sí, formando fascículos o reunidos compactamente constituyendo coremios. Estas hifas fértiles pueden lisas o rugosas, terminando en la parte superior en un verticilo de ramas en forma de pincel (de donde la viene el nombre al género).

El verticilo puede ser sencillo y en este caso, sobre el ápice de la hifa fértil nacen las fialides que, a su vez, dan lugar a las esporas, a esta estructura responden los *Penicillium* monoverticilados. O bien el final de la hifa fértil puede presentar una ramificación una o varias veces verticiladas, siendo el verticilo terminal el de fialides, que darán lugar a las esporas, esto es en el caso de los *Penicillium* diverticilados.

Los conidios se producen por escisión del ápice de las fialides y forman cadenas no ramificadas de esporas, como en el género *Aspergillus*.

La forma de las esporas puede ser: globosa, ovoide, elíptica o piriforme, pudiendo presentar la superficie lisa, rugosa o espinosa. Por regla general, son de color verde, aunque pueden también tomar tonos pálidos, e incluso ser incoloros.

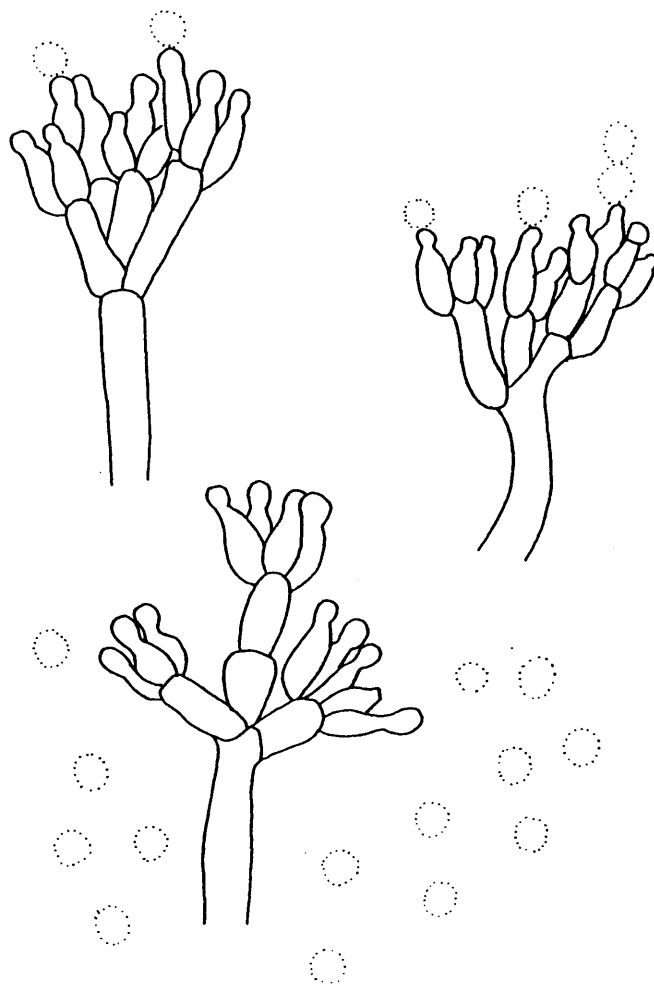
Algunas especies producen peritecios y otras esclerotios.

Las diferencias esenciales entre los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son:

- . Que el género *Aspergillus* forma la vesícula en la parte apical de la hifa fértil y
- . Que en el género *Penicillium* existen las células basales características.

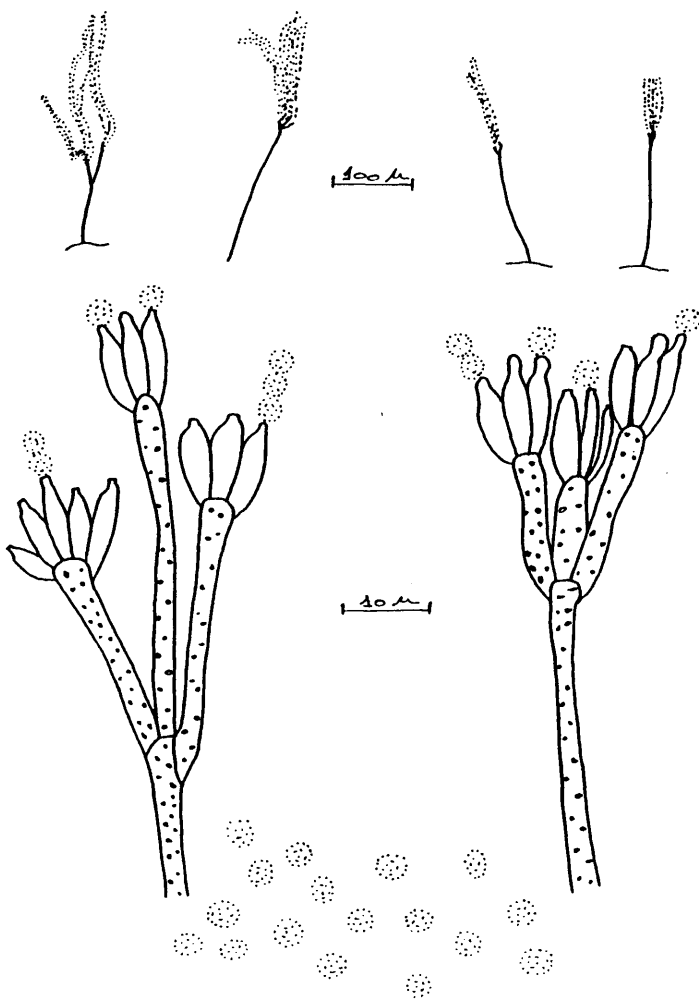
Para la identificación de las distintas especies de este género hemos seguido la monografía de Raper (1949).

Las especies que hemos aislado son: *P. brevi-compactum*, *P. jense-
ni*, *P. notatum*, *P. terlikowskii*, *P. corylophilum*, *P. resticulosum*, *P. spinulo-
sum*, *P. cyclopium*, *P. frequentans*.



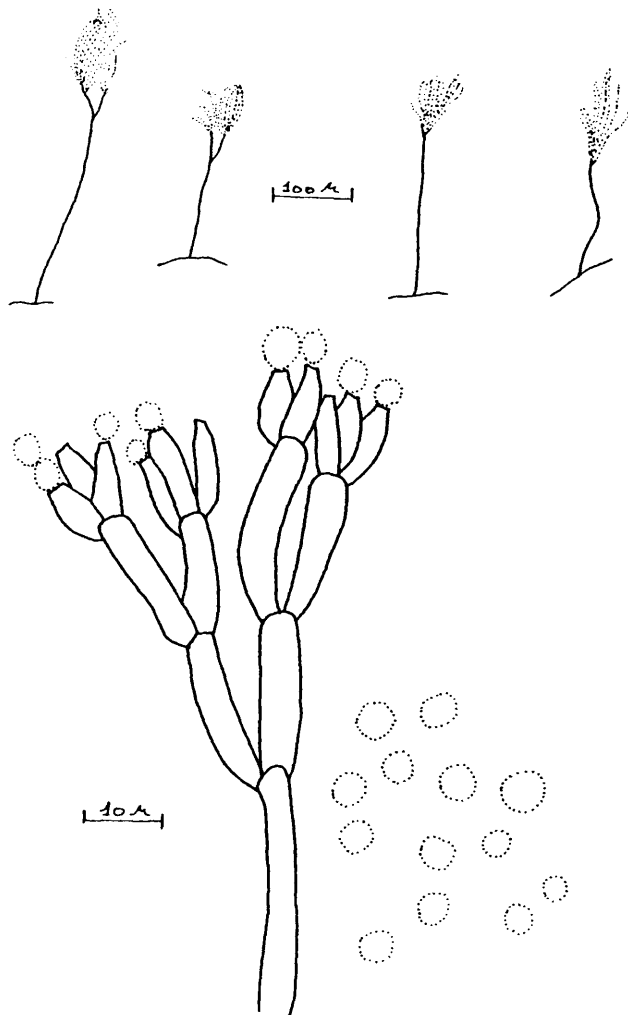
Penicillium brevi-compactum Dierckx

127



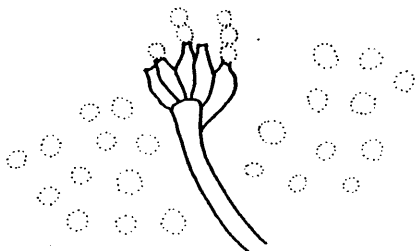
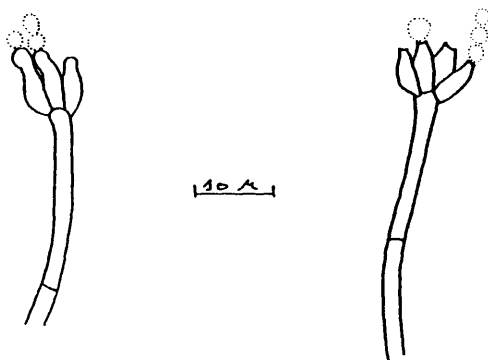
Penicillium jensenii Zaleski

128



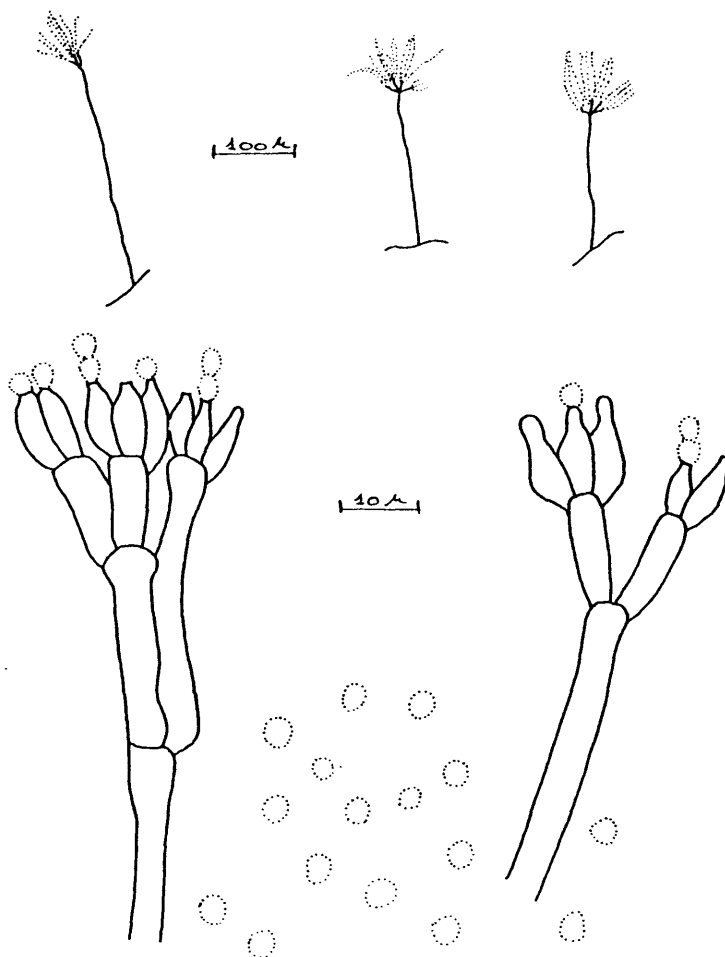
Penicillium notatum Westling

129



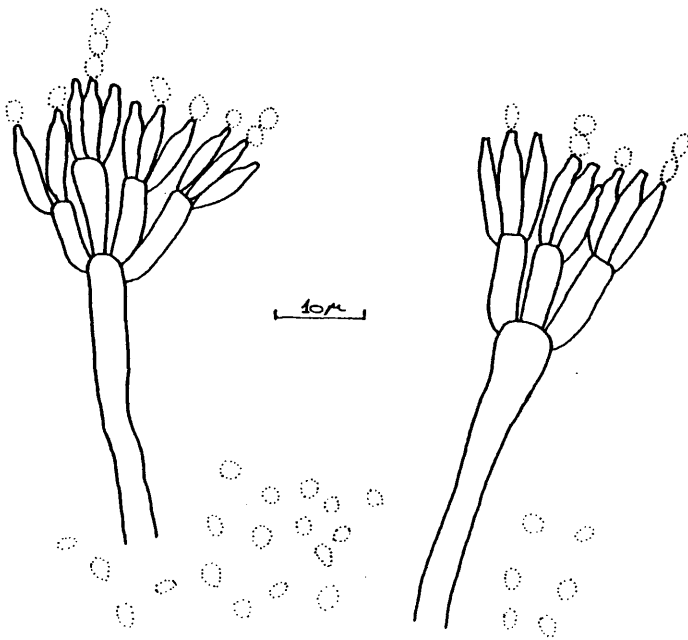
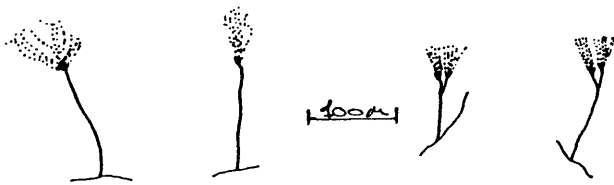
Penicillium terlikowskii Zaleski

130



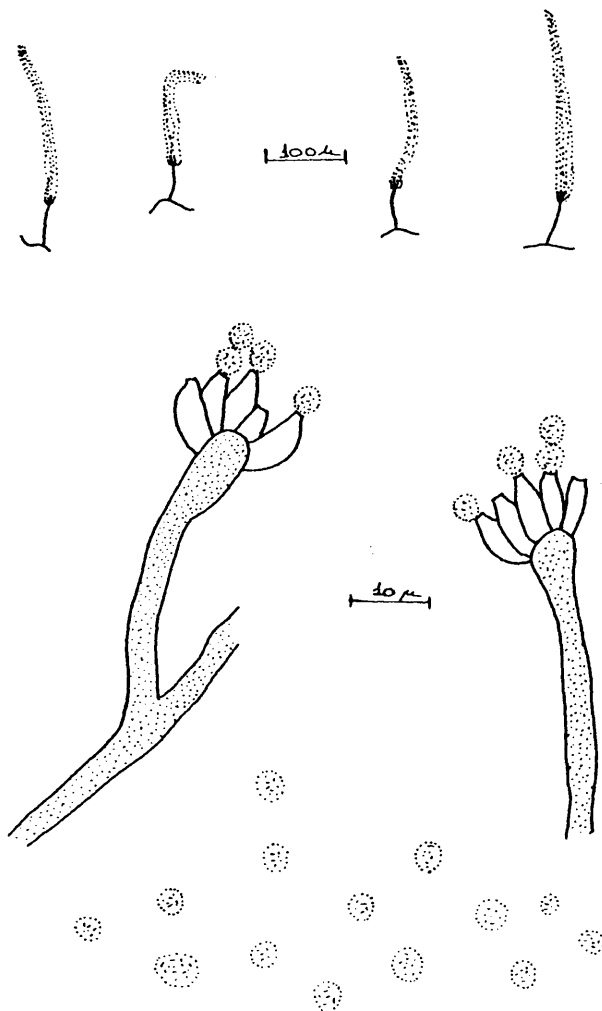
Penicillium corylophilum Dierckx

131



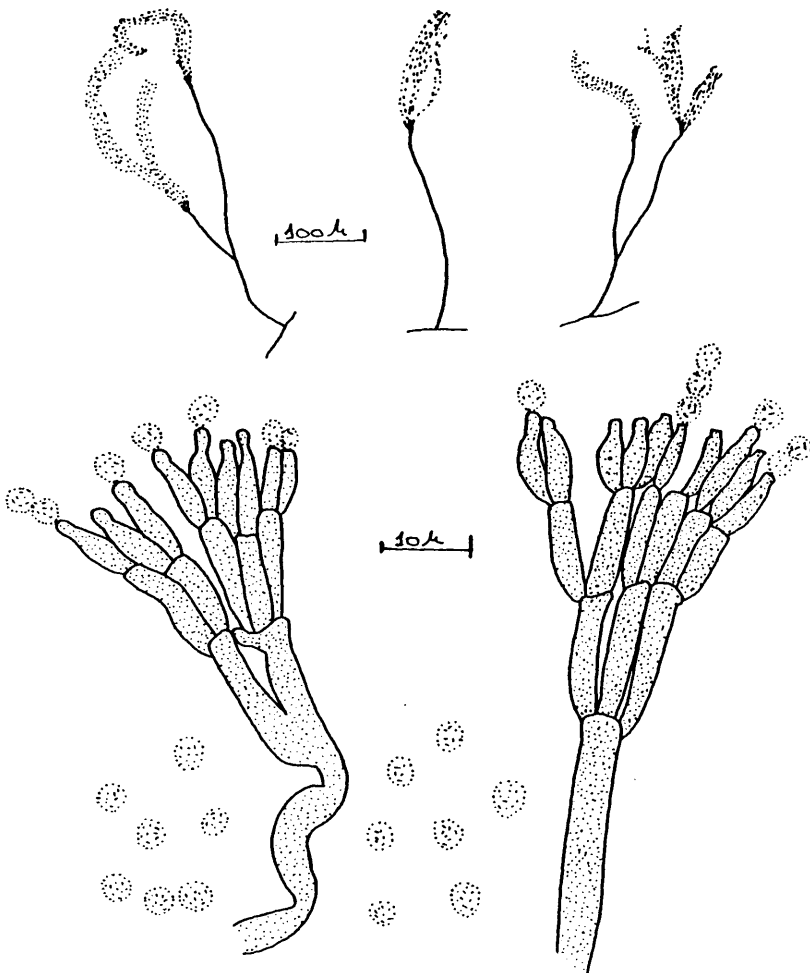
Penicillium resticulosum Birkinshaw

132



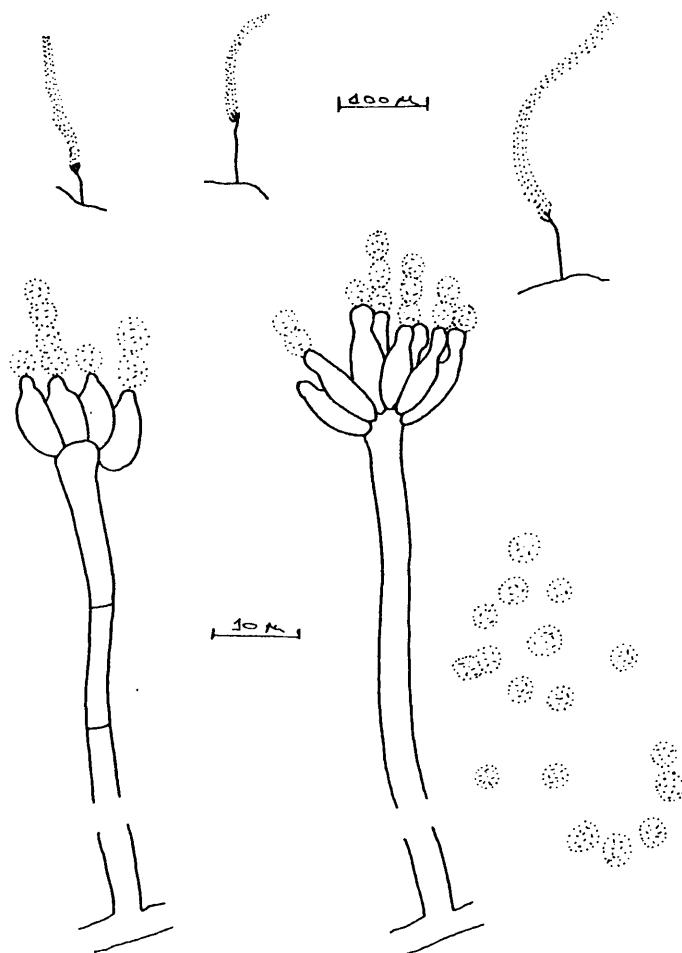
Penicillium spinulosum Thom

133



Penicillium cyclopium Westling

13h



Penicillium frequentans Westling

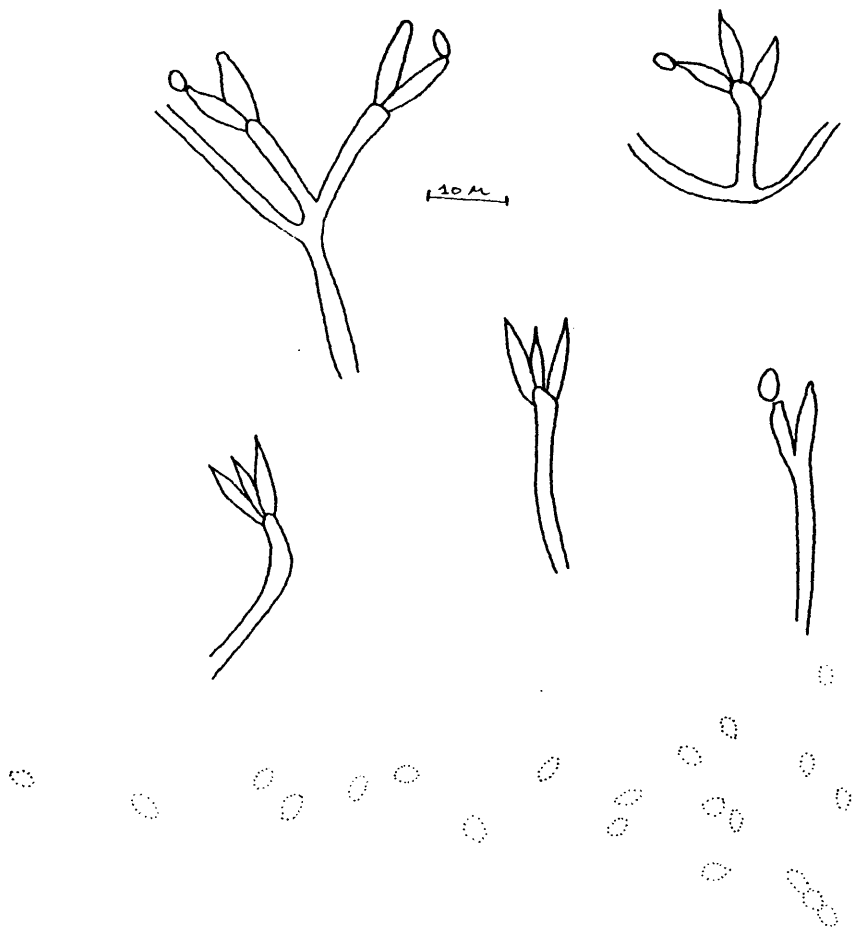
Paecilomyces sp. *Bainier*

Sus colonias pueden tener color blanco, rosa pálido, lila o pardo amarillento, pero nunca verdes. Presentando una textura compacta, flocosa o funiculosa.

Las estructuras reproductoras pueden presentar distintos - grados de complejidad. Los conidioforos no presentan ensanchamiento apical. Las fialides tienen forma de botella, presentando un estrechamiento en la parte apical, donde se producen las esporas, que son generalmente ovales y forman cadenas largas y secas.

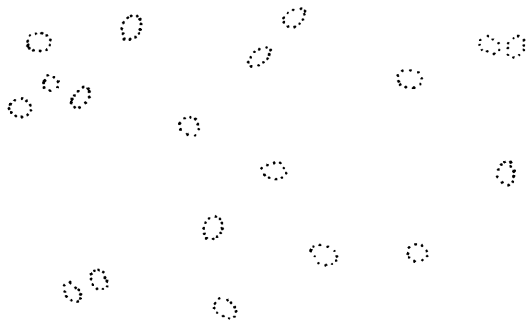
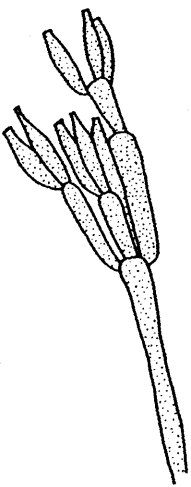
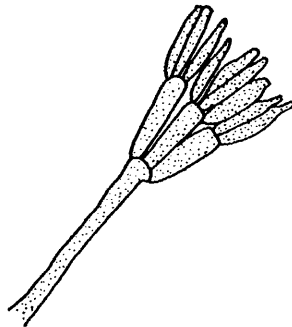
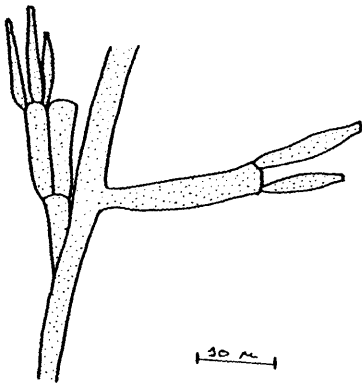
La especie encontrada en nuestro estudio ha sido identificada siguiendo los criterios de Samson (1974), resultando ser *P. puntonii*.

136



Paecilomyces puntonii (Vuill.) Nannizzi

137



91

Paecilomyces sp. Bainier

El grupo cuarto reúne a los géneros que se reproducen por blastoporas o blastoconidias.

Los géneros de este grupo identificados en el presente estudio han sido:

- Monilia
- Cladosporium
- Aureobasidium
- Botrytis
- Alternaria
- Stemphylium
- Curvularia
- Ulocladium
- Veronaea.

Monilia sp. Pers. ex Fr.

Género muy heterogéneo, que se caracteriza por la producción de cadenas ramificadas de esporas en forma de cuentas.

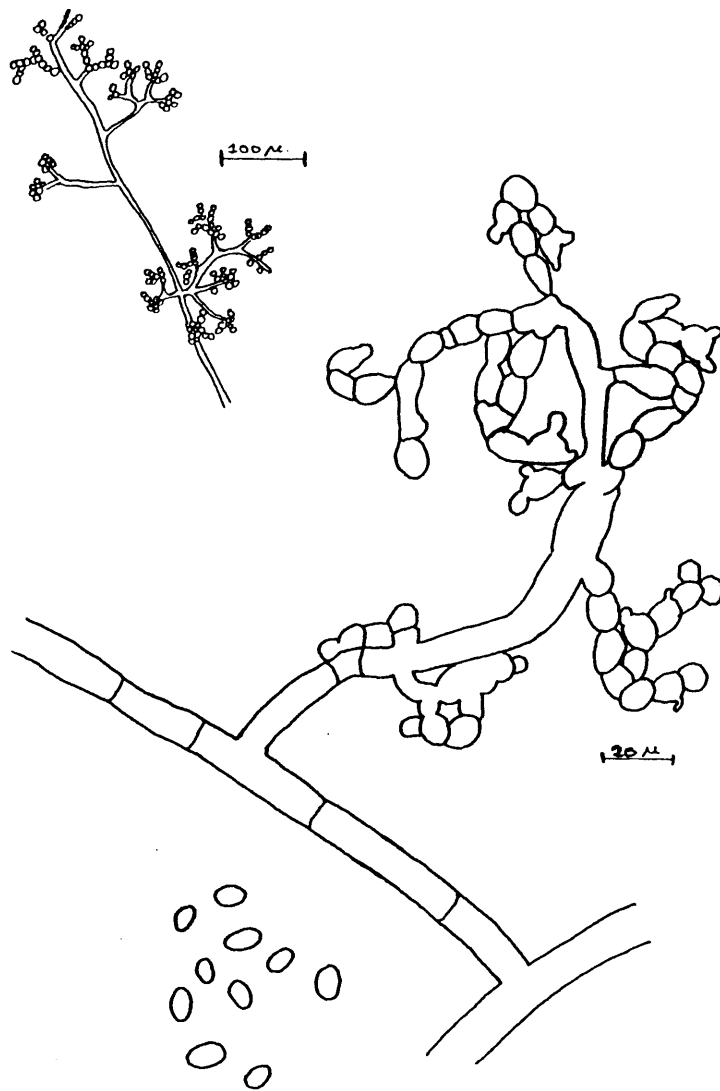
Las hifas y conidioforos son anchos, normalmente de colores claros.

Los conidios son unicelulares de forma esférica o elíptica.

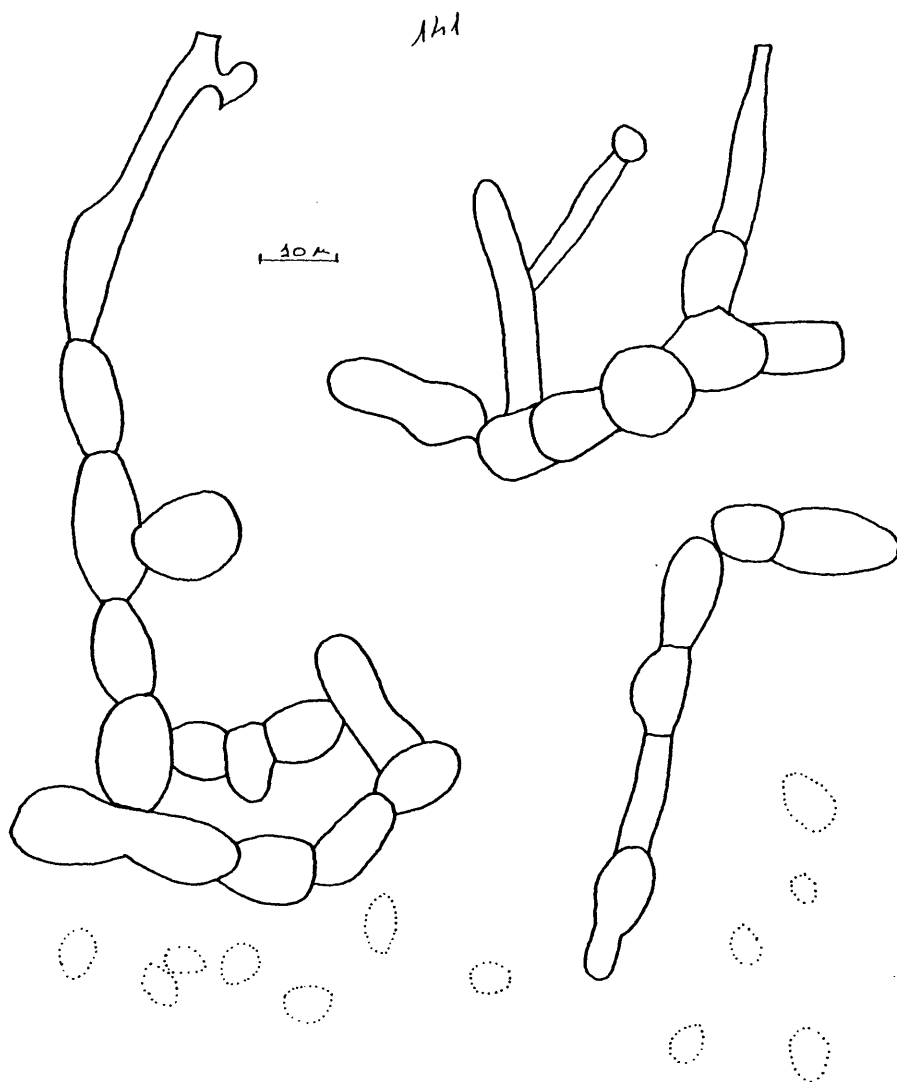
En el presente trabajo la especie que se ha aislado ha sido la *M. sitophila* (Saccardo).

Esta especie forma colonias de textura suelta, de rápida proliferación, siendo al principio de color blanquecino, tornándose rosado y después salmón. El crecimiento es tan rápido en épocas con temperaturas altas, que el micelio en 24 horas llega a salir de la placa de Petri.

140



Monilia sitophila (Montagne) Saccardo



Monilia sp. Pers ex Fr.

Cladosporium sp. Link ex Fr.

Las colonias son densamente aterciopeladas, de color que va
ría entre verde intenso, verde grisáceo oscuro y negro verd
so, con reverso negro azulado opalescente en la mayoría de
los casos.

Observando los cultivos en vivo, a pequeño aumento, se pue-
den ver las formas arborescentes en que se disponen las espo
ras.

Las hifas y los conidioforos normalmente miden de dos a cua-
tro micras de ancho, e incluso mas, cuando llegan a oscure-
cer. El conidioforo normalmente es recto y ramificado.

El micelio de las especies del género *Cladosporium* tiene ten
dencia a formar masas estromáticas, agregaciones mas o menos
regulares en cuerpos globulares o laminares, de color marrón
oscuro.

En el micelio se pueden formar clamidosporas, que pueden ser
simples o formar cortas cadenas.

Las esporas cuando germinan producen yemas, recordando a las
levaduras, produciéndose luego masas arborescentes en cade-
nas muy ramificadas.

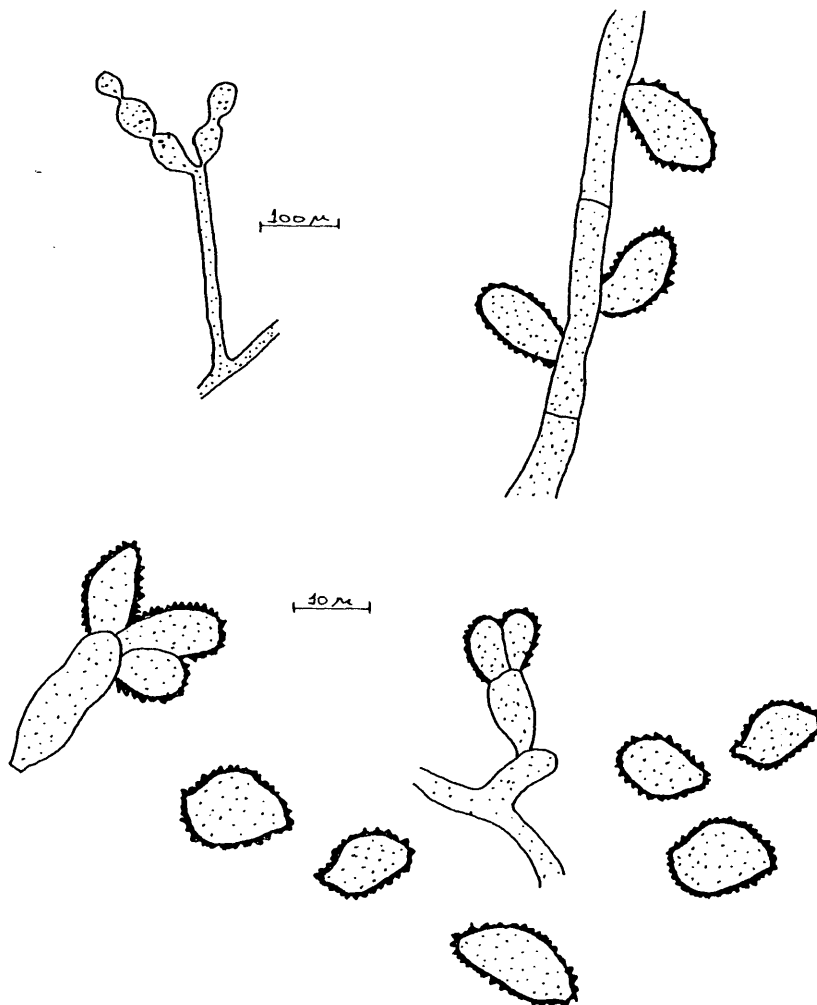
Las esporas jóvenes son la mayoría unicelulares y las mas -
viejas pueden tener dos o incluso mas células, divididas en
tabiques transversales. Estas células no se pueden despren-
der entre sí.

La superficie de las conidias puede ser verrugosa o lisa, se
gún las especies. Tanto conidias como células conidiógenas
son normalmente pigmentadas.

Anteriormente, el nombre de *Cladosporium* se reservó para designar a las especies que formaban esporas tabicadas, llamándose *Hormodendron* a las especies que tenían las esporas unicelulares. En la actualidad no se hace esta distinción, ya que se considera que en la primeras fases del desarrollo se producen mas proporción de esporas unicelulares y posteriormente aumenta la de pluricelulares.

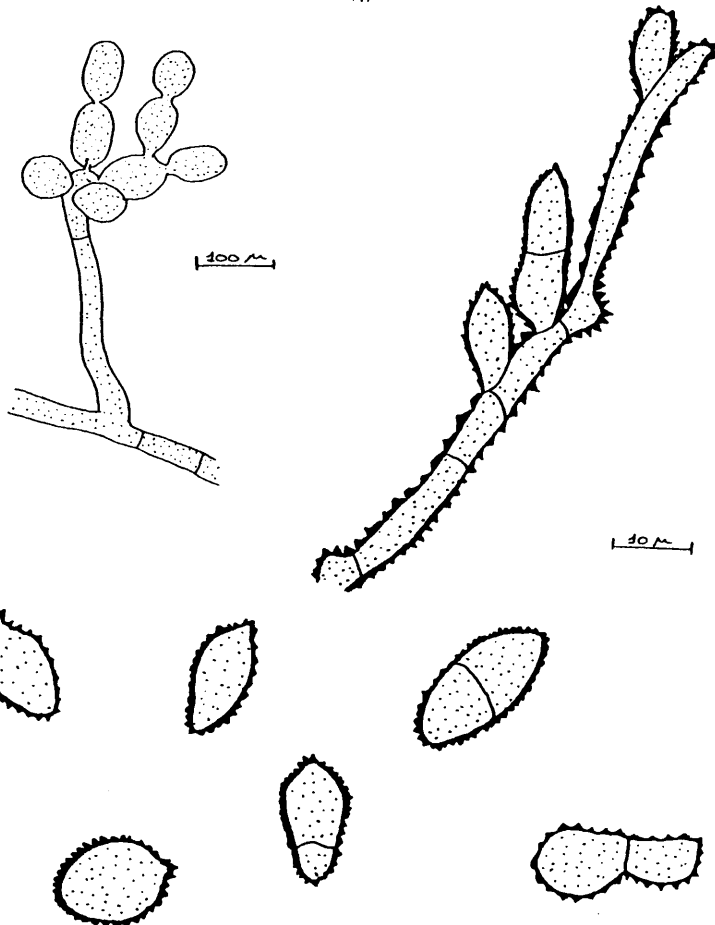
En el presente estudio para identificar las distintas especies de este género nos hemos basado en el criterio seguido por De Vries (1967). Las especies identificadas son: *Cl. herbarum*, *Cl. macrocarpum*, *Cl. cladosporoides*.

144



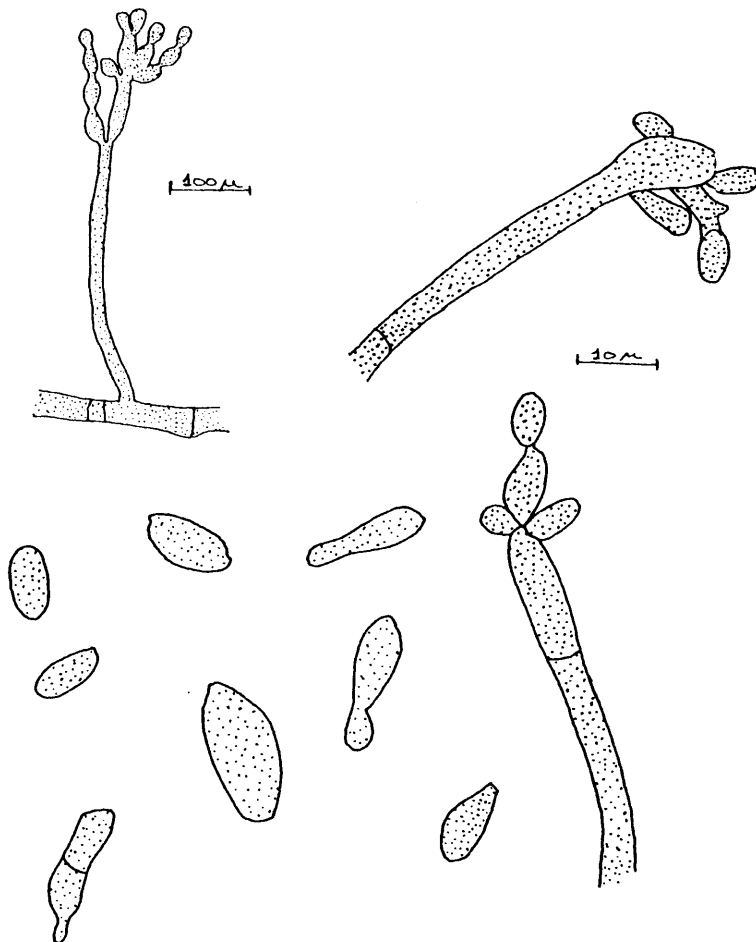
Cladosporium herbarum Link ex Fr.

148



Cladosporium macrocarpum Preuss

146



Cladosporium cladosporoides Fress.

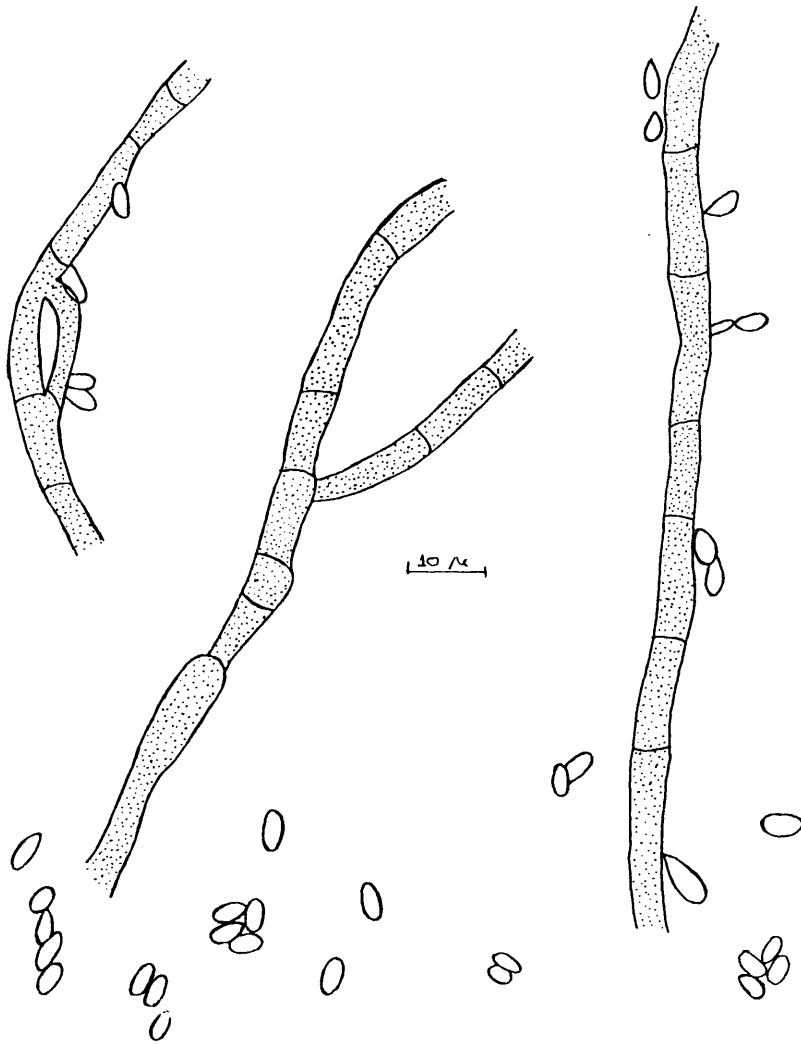
Aureobasidium sp. *Viala y Boyer*

Presenta colonias levaduriformes, extendidas en el medio, de color oscuro en toda su extensión y coriáceas.

Los conidios se forman por gemación, naciendo simultáneamente de las hifas y de ramas hinchadas; la forma de los conidios es casi siempre oval.

La especie que hemos identificado en el presente trabajo - ha sido *A. pullulans*.

148



Aureobasidium pullulans Viala y Boyer

Botrytis sp. Pers ex Fr.

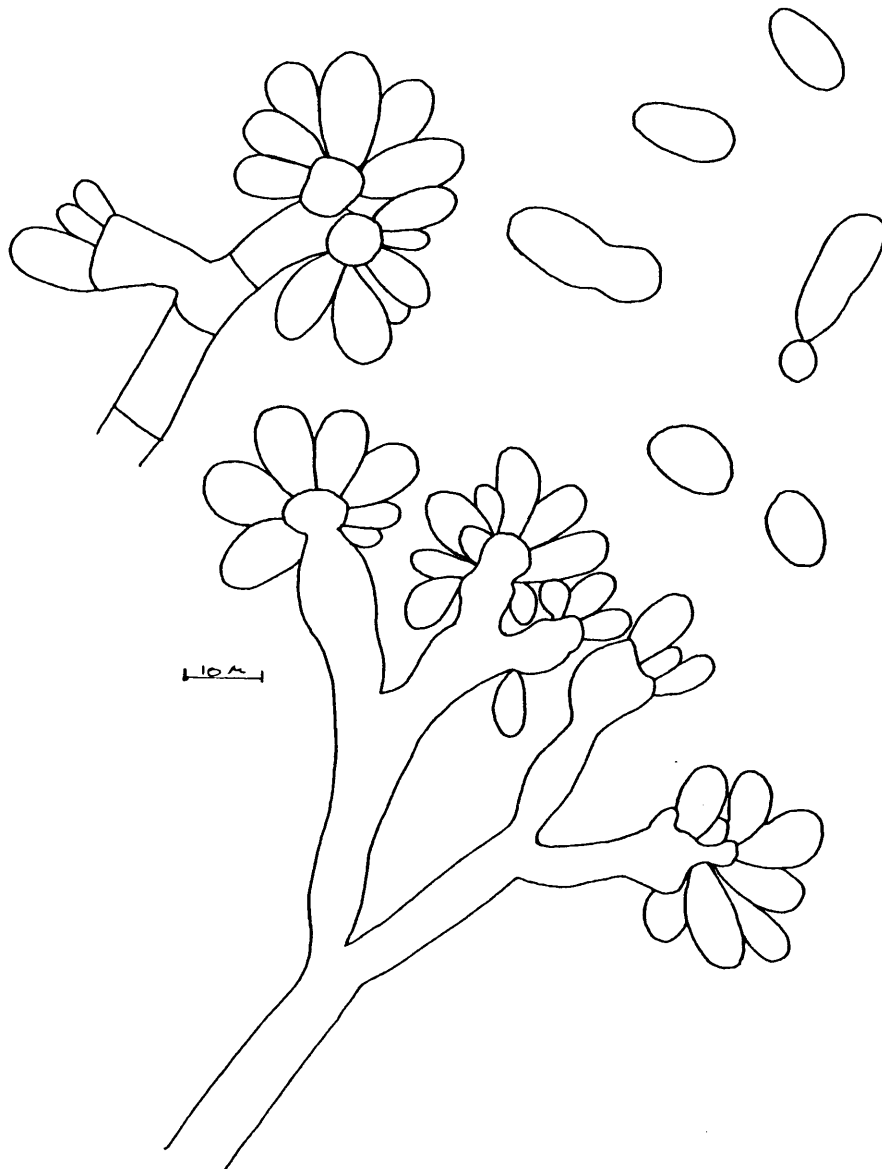
En los medios de cultivo usuales forman colonias que en un principio son blancas, volviéndose al esporular color gris mas o menos intenso, o un poco marronáceo, según las especies.

Los conidioforos son rectos o flexuosos, de superficie lisa, son ramificados, septados, dicotomizados o tricotomizados.

Las ramas finales generalmente terminan en un hinchamiento esférico o mas o menos claviforme, sobre el que se disponen pequeños y cortos esterigmas de los que nacen los conidios, que suelen ser unicelulares, hialinos o muy debilmente coloreados, presentando una forma ovoide, subesférica o elíptica.

La especie identificada ha sido *B. cinerea*.

150



Botrytis cinerea Pers ex Fr.

Alternaria sp. *Nees ex Fr.*

Las especies de este género presentan colonias que normalmente se extienden en toda la superficie del medio, tomando coloraciones oscuras.

Las hifas son septadas y también oscuras.

Los conidioforos pueden ser simples o irregularmente ramificados.

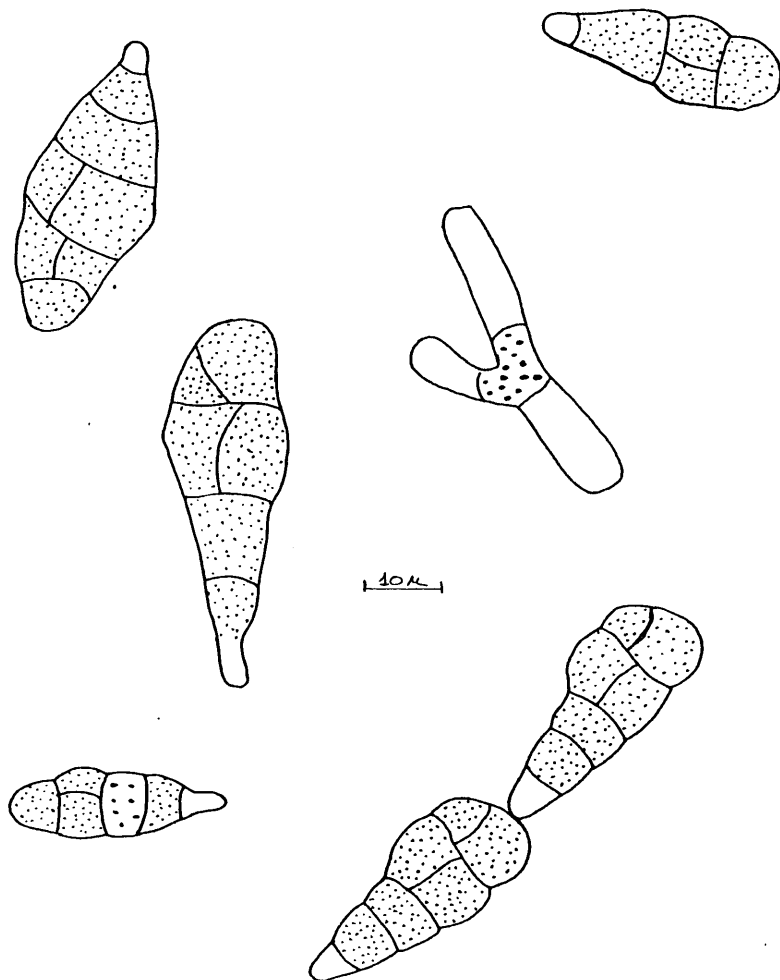
Las conidias son oscuras, irregularmente tabicadas, generalmente piriformes u ovoides mas o menos alargadas en el ápice, naciendo en cadenas acropetas. Su ápice a veces es ramificado.

La superficie de los conidios puede ser lisa o mas o menos verrugosa. Este tipo de esporas es denominado Dictyospora.

Para separar este género de los próximos a él, se ha seguido los criterios propuestos por Simmons (1967) y para la identificación de las distintas especies, el trabajo monográfico sobre el género de Joly (1964).

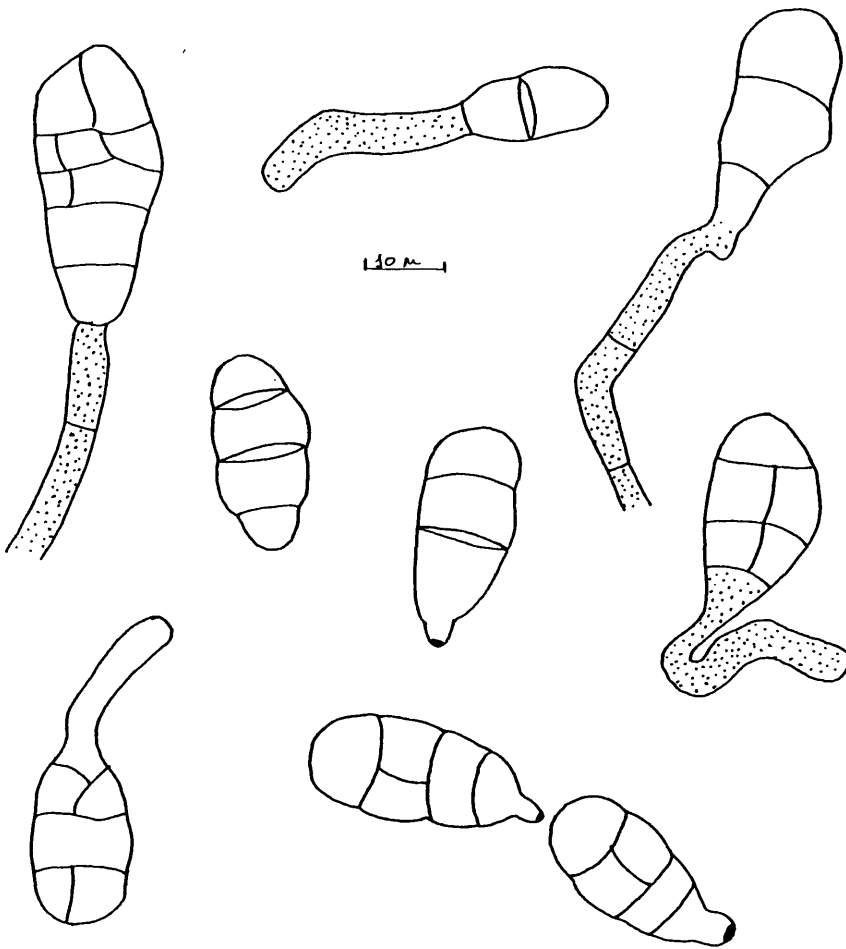
Las especies aisladas son: *A. tenuissima* y *A. chartarum*.

152



Alternaria tenuissima (Fries) Wiltshire

153



Stemphylium sp. Wallr.

Se caracterizan por la presencia de esporas muriformes --
(dictiosporas) sobre conidioforos bien diferenciados.

Colonias marrones.

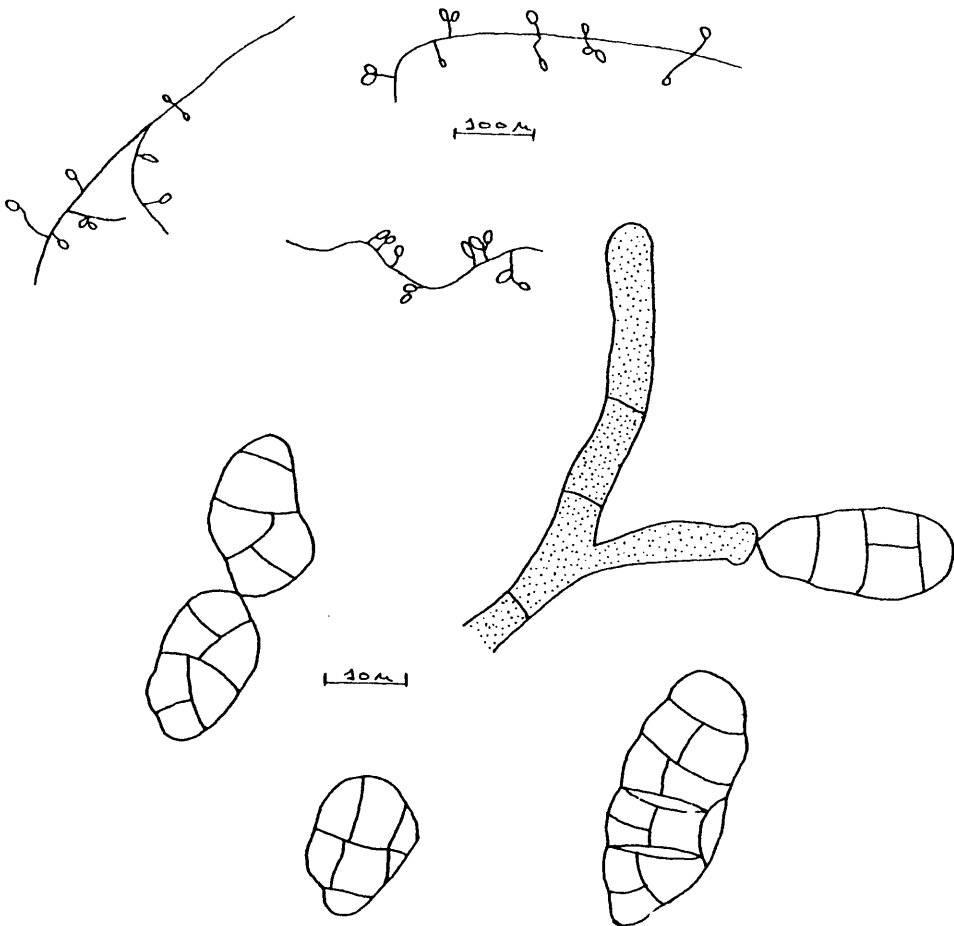
Los conidioforos son oscuros y sus paredes pueden ser lisas o rugosas.

Los conidios maduros poseen septos longitudinales u oblicuos, pudiendo ser globosos, elípticos u ovoidales, lisos, verrugosos o equinulosos. Son producidos como un crecimiento protoplásmico a partir de un poro terminal, pudiendo -- ser también a partir de un apéndice del crecimiento secundario. Se producen series de tres o mas proliferaciones apicales y conidios terminales o laterales.

La especie aislada en nuestro trabajo ha sido *S. botryosum*, considerada como el estado imperfecto de *Pleospora herbarum*.

Nos basamos en los trabajos de Simmons (1967).

155



Stemphylium botryosum Wallr.

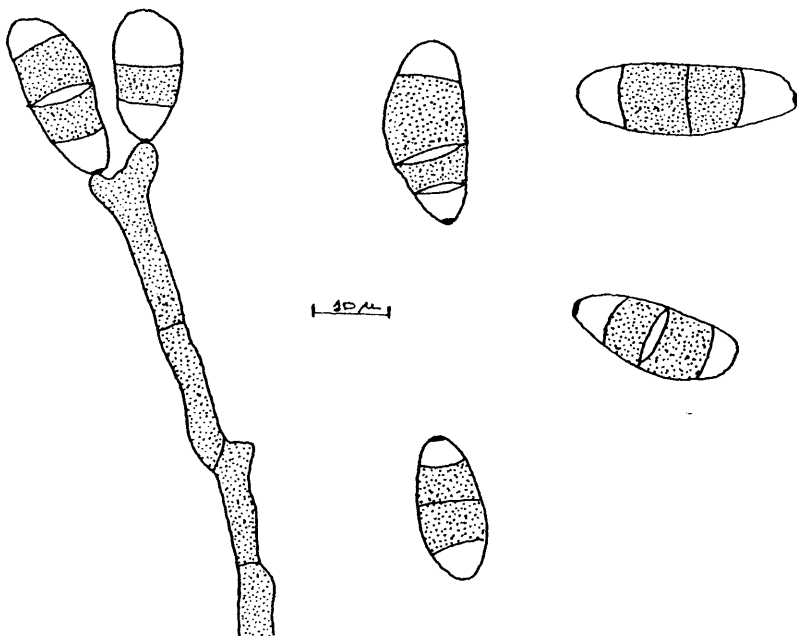
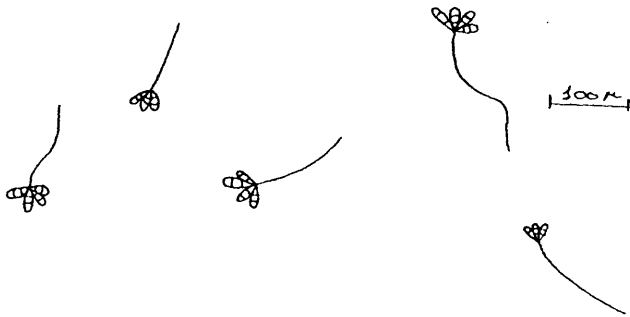
Curvularia sp. *Alcorn*

Tanto el micelio como las esporas son de color oscuro; conidios en conidioforos septados mas o menos erectos. En el ápice del conidioforo se produce un conidio, aquél continúa su desarrollo precisamente por debajo de ésta y forma una nueva conidia terminal que empuja la primera hacia un lado. El proceso se sucede hasta que se forma un racimo.

Los conidios tienen tres o cuatro septos transversales y están en su mayor parte curvadas hacia la tercera célula de la base, la cual es mas ancha y oscura que las otras.

La especie aislada por nosotros ha sido *C. richardiae*, siguiendo el tratado de Ellis (1976).

157



Curvularia richardiae Alcorn

Ulocladium sp. *Simmons*

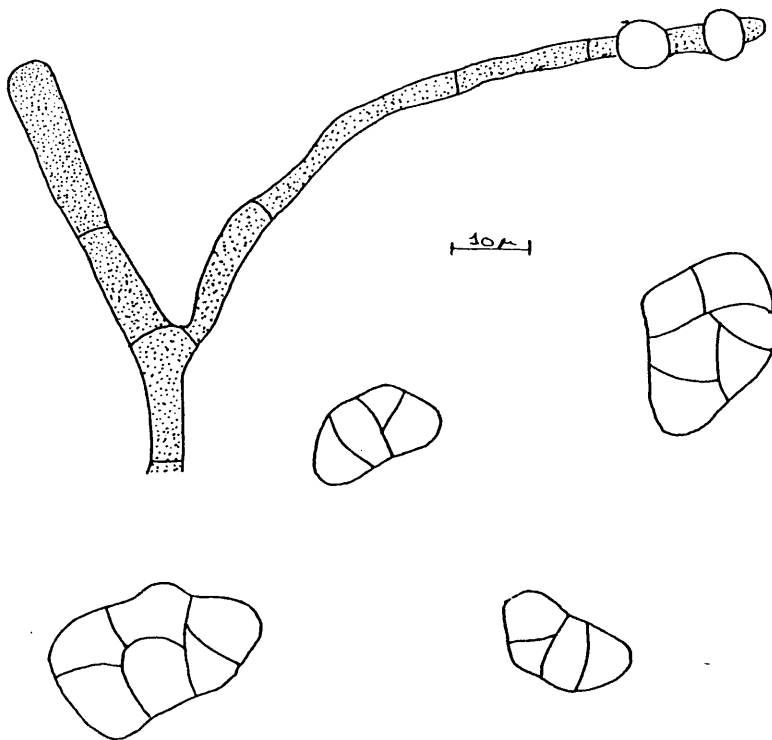
Es un género muy semejante a *Alternaria* y *Stemphylium*.

Conidios oscuros, dictiosporas.

Los conidios surgen de ramas verticales del micelio. Son os
curos y septados.

La especie aislada por nosotros en nuestro estudio ha sido
U. alternariae.

159



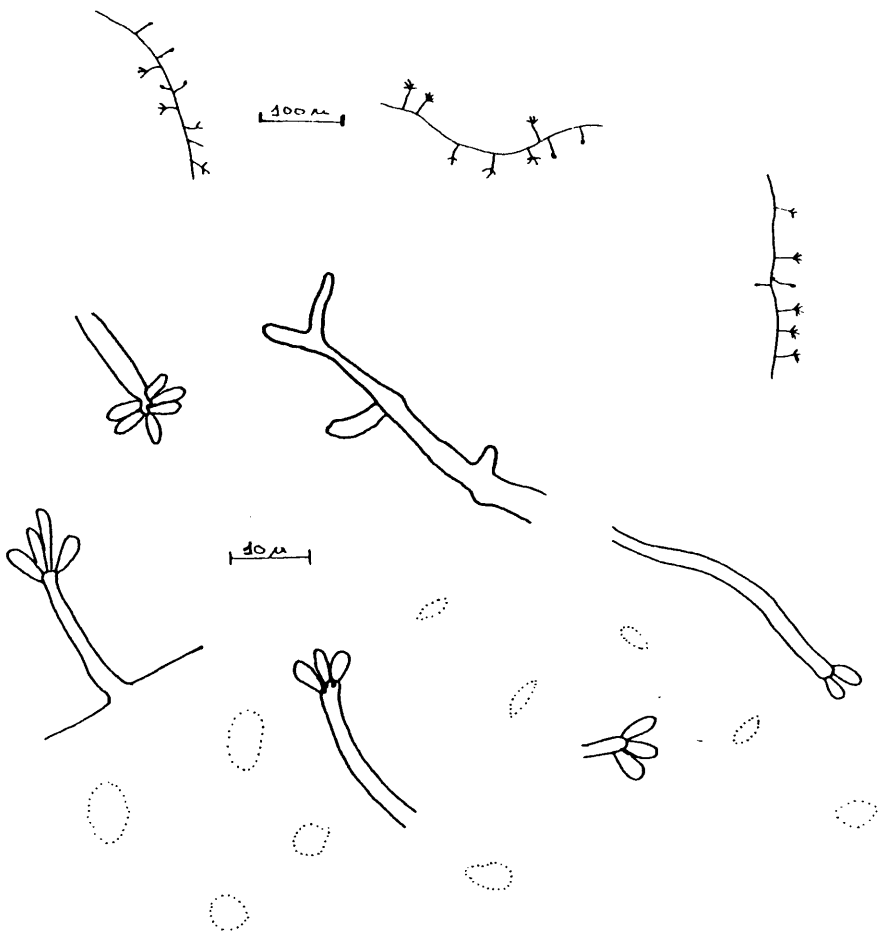
Ulocladium alternariae Simmons

Veronaea sp. Ellis

Conidioforos ramificados, largos, con células conidiógenas elongadas.

Conidios con o sin septos, esféricos u subesféricos, fusi-
formes, cilíndricos o elipsoidales, verrugosos o lisos.

161



Veronaea musae Ellis

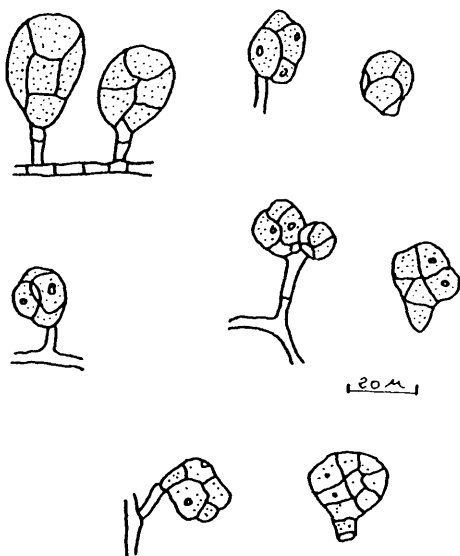
El quinto grupo reúne a los géneros que producen aleuriosporas o clamidiosporas.

Pertenecientes a este grupo hemos aislado el género *Monodictys*.

Monodictys sp. *Hughes*

De colonia pigmentada y no muy extendida. Tanto el conidioforo como la célula conidiógena son indiferenciadas.

Los conidios tienen mas de dos células, con tabiques transversales y longitudinales, de forma redondeada.



Monodictys levis (Wiltshire) Hughes

O. Micelia sterilia

Dentro de este grupo reunimos a todos los hongos que no tienen estructuras reproductoras conocidas. Por tanto es un grupo muy heterogéneo.

Levaduras

La estructura vegetativa característica de los ASCOMYCETES; Basidiomycetes y Deuteromycetes es el micelio cenocítico.

Sin embargo, hay unos cuantos grupos dentro de estas clases que han perdido en gran parte su forma miceliar de crecimiento, encontrándose normalmente en forma unicelular. Tales organismos se conocen colectivamente con el nombre de levaduras. Para la identificación de las mismas hemos seguido los criterios de Loddner (1974).

Las levaduras que se han aislado en el presente estudio han sido:

Sporobolomyces

Torulopsis

Rhodotorula.



Sporobolomyces roseus

- . Forma colonias de color rosa anaranjado
- . Forma pseudomicelio rudimentario
- . No forma micelio
- . No fermenta los compuestos carbonados
- . Asimilación de compuestos carbonados:

Glucosa	+	D-Xylosa	+
Galactosa	+	L-Arabinosa	+
Sorbosa	+	D-Arabinosa	+
Sacarosa	+	Erythritol	-
Maltosa	+	Ribitol	+
Celobiosa	-	Galactitol	-
Trehalosa	+	D-Manitol	+
Lactosa	-	D-Glucitol	+
Melibiosia	-	Salicina	+
Rafinosa	+	Ac. succinico	+
Melizitosa	+	Ac. cítrico	+
Inulina	-	Inositol	-
Almidón soluble	+	Etanol	+
Glicerol	+		

- . Asimilación de los compuestos de Nitrógeno:

Nitrato potásico +
 Nitrito potásico +

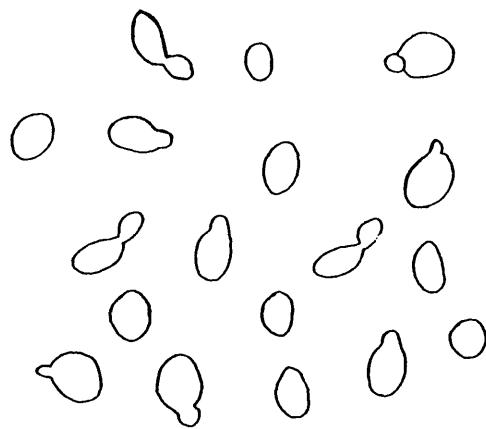
- . Crecimiento a 37º C -
- . Crecimiento a 30º C -

Torulopsis candida

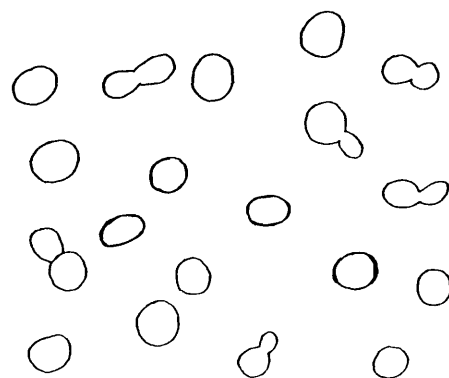
- . Forma colonias de color blanquecino
- . Células esféricas a ovoidales
- . No forman pseudomicelio
- . No fermenta la glucosa, sacarosa, rafinosa y trehalosa
- . Asimilación de compuestos carbonados:

Glucosa	+	D-Arabinosa	<u>+</u>
Galactosa	+	D-Ribosa	<u>+</u>
L-Sorbosa	<u>+</u>	L-Rhamnosa	<u>+</u>
Sacarosa	+	Etanol	+
Maltosa	+	Glicerol	+
Celobiosa	+	Eritritol	<u>+</u>
Trehalosa	+	Ribitol	+
Lactosa	<u>+</u>	Galactitol	<u>+</u>
Melibiosa	<u>+</u>	D-Manitol	+
Rafinosa	+	D-Glucitol	+
Melizitosa	<u>+</u>	α -Metil - D-Glucosido	+
Inulina	<u>+</u>	Salicina	+
Almidón soluble	<u>+</u>	DL-ácido láctico	+
D-Xylosa	+	Ac. succinico	+
L-Arabinosa	+	Ac. cítrico	+
Inositol	-		

- . Asimilación de Nitrato potásico -
- . Máxima temperatura de crecimiento: 32 - 37° C



Sporobolomyces roseus Kluyver et van Niel



Torulopsis candida (Saito) Lodder

Rhodotorula rubra

- . Colonias de color anaranjado rosáceo
- . Células ovoides o alargadas
- . No forma pseudomicelio
- . Asimilación de compuestos de Carbono:

Glucosa +	D-Ribosa <u>+</u>
Galactosa <u>+</u>	L-Rhamnosa <u>-</u>
L-Sorbosa <u>+</u>	Etanol <u>+</u>
Sacarosa +	Glicerol <u>+</u>
Maltosa +	Eritritol -
Celobiosa <u>+</u>	Ribitol +
Trehalosa +	Galactitol -
Lactosa -	D-Manitol <u>+</u>
Melibiosa -	D-Glucitol <u>+</u>
Rafinosa +	α -Metil - D-Glucósido <u>+</u>
Melizitosa +	Salicina <u>+</u>
Inulina -	DL-Acido láctico <u>+</u>
Almidón soluble -	Ac. Succinico <u>+</u>
D-Xylosa +	Ac. Cítrico <u>+</u>
L-Arabinosa +	Inositol -
D-Arabinosa +	

- . Asimilación de compuestos nitrogenados:
- Nitrato potásico -
- Nitrito potásico -

Rhodotorula glutinis var. *glutinis*

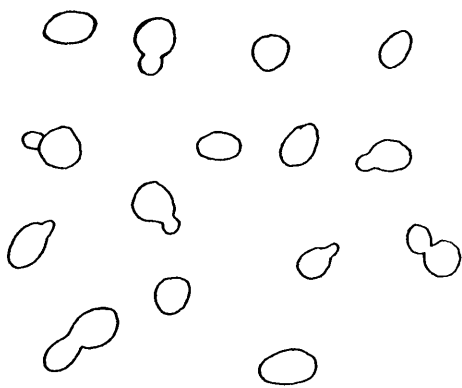
- . Colonias de color anaranjado rosáceo
- . Células ovoides o alargadas
- . No forma pseudomicelio
- . No fermenta los hidratos de Carbono
- . Asimilación de compuestos de Carbono:

Glucosa +	L-Rhamnosa +
Galactosa +	Etanol +
L-Sorbosa +	Glicerol +
Sacarosa +	Ribitol +
Maltosa +	D-Manitol +
Celobiosa +	D-Glucitol +
Treahalosa +	Salicina +
Lactosa -	Ac. Succinico +
Melibiosa -	Ac. Cítrico +
Rafinosa +	L-Arabinosa +
Melizitosa +	D-Arabinosa +
Almidón soluble -	Inositol -
D-Ribosa +	

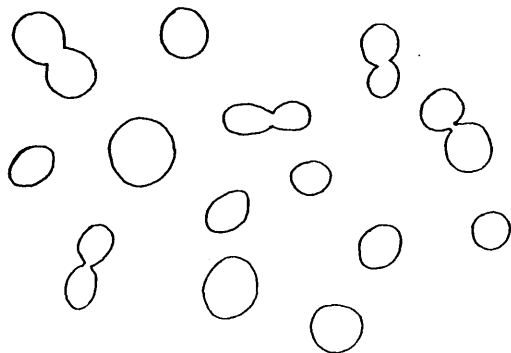
- . Asimilación de compuestos de Nitrógeno:

Nitrato potásico +
Nitrito potásico +

171



Rhodotorula rubra (Demme) Lodder



Rhodotorula glutinis (Fres) Harrison
var. *glutinis*

V.2. ESTUDIO ECOLOGICO DE LA POBLACION FUNGICA

V.2.1. Porcentajes de aparición

En relación con los porcentajes de aparición que han presentado las distintas marcas estudiadas, podemos establecer dos grupos:

a) Grupo formado por aquellos géneros cuya aparición es esporádica. Perteneciendo a este grupo:

Circinella
Mycotypha
Cunninghamella
Phoma
Epicoccum
Geotrichum
Acremonium
Fusarium
Aphanocladium
Paecilomyces
Monodictys
Aureobasidium
Botrytis
Stemphylium
Curvularia
Ulocladium
Veronaea.

b) Aquéllos cuya frecuencia de aparición es elevada en todas las marcas y sabores estudiados, siendo éstos:

Penicillium
Monilia
Cladosporium
Micelia sterilia

Alternaria
Rhizopus
Aspergillus
Levaduras

Por esta razón, los diversos estudios realizados sobre la población fúngica del yogur están dirigidos a este grupo, que estudiaremos con mayor profundidad.

Se han estudiado las frecuencias de los distintos géneros encontrados en las marcas y sabores analizados para cada una de las diluciones, dependiendo de los distintos medios de cultivo empleados.

El orden en que hemos situado los géneros en las distintas tablas, ha sido de mayor a menor frecuencia de aparición.

Estos resultados vienen expresados detalladamente en las tablas comprendidas desde la tabla A.1 hasta la tabla A.24.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la toma directa, inicial, en agar malta

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	21,4	21,4	27,5	40,7	42,8	35,7	34,6	20,6	19,2
MONILIA	14,2	21,4	24,1	33,3	21,4	35,7	23,0	20,6	19,2
LEVADURAS	3,5	17,8	13,7	3,7	3,5	3,5	15,3	6,8	7,6
CLADOSPORIUM	7,1	10,7	0	3,7	7,1	10,7	0	6,8	0
micelia _{sterilia}	3,5	0	3,4	3,7	3,5	3,5	0	0	0
ALTERNARIA	3,5	0	0	0	3,5	3,5	0	0	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	0	0	3,8	0	0
ASPERGILLUS	0	0	3,4	0	0	0	0	0	0

tabla A.1.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados
en la toma directa , inicial , en sabouraud

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	25	10,7	17,2	40,7	21,4	21,4	26,9	27,5	7,6
MONILIA	14,2	25	24,1	11,1	17,8	32,1	23	24,1	15,3
LEVADURAS	7,1	17,8	17,2	3,7	3,5	10,7	23	3,4	3,8
CLADOSPORIUM	0	0	3,4	11,1	3,5	3,5	3,8	0	0
micelia sterilia	14,2	3,5	0	11,1	3,5	10,7	0	0	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	0	0	0	3,4	0
ASPERGILLUS	0	3,5	0	0	0	0	0	0	0

tabla . A . 2 .

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la toma directa, inicial, en czapek

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	14,2	14,2	27,5	14,8	25	25	23	10,3	11,5
MONILIA	0	14,2	17,2	22,2	14,2	21,4	15,3	24,1	19,2
LEVADURAS	10,7	17,8	6,8	3,7	3,5	0	7,6	0	0
CLADOSPORIUM	3,5	0	0	3,7	3,5	3,5	3,8	0	0
ASPERGILLUS	3,5	0	3,4	0	0	0	0	0	0

tabla A.3.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la toma directa , inicial, en czapek mas extracto de levadura

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	35,7	10,7	20,6	22,2	14,2	25	23	20,6	19,2
MONILIA	14,2	21,4	6,8	29,6	25	35,7	26,9	10,3	15,3
LEVADURAS	10,7	10,7	10,3	14,8	7,1	7,1	3,8	6,8	3,8
CLADOSPORIUM	14,2	10,7	6,8	3,7	3,5	0	3,8	0	0
micelia sterilia	3,5	0	0	0	0	3,5	0	0	0
ASPERGILLUS	3,5	0	0	0	0	0	0	0	0

tabla A. 4.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados
en la toma directa , final , en agar malta

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	28	25	40	50	36	50	45,8	25,9	23
PENICILLIUM	24	20,8	24	12,5	40	20,8	16,6	18,5	15,3
LEVADURAS	8	20,8	8	4,1	8	8,3	0	0	3,8
CLADOSPORIUM	16	0	4	8,3	8	4,1	4,1	0	0
ASPERGILLUS	0	4,1	0	0	12	4,1	4,1	0	0
micelia sterilia	0	0	0	4,1	0	0	0	0	0

tabla A . 5.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados
 en la toma directa ,final , en sabouraud

<div> <div>marcas y sabores</div> <div>generos</div> </div>	A			B			C		
	nat	fresa	plat	nat	fresa	plat	nat	fresa	plat.
MONILIA	20	20,8	36	29,1	40	58,3	33,3	25,9	23
PENICILLIUM	28	25	32	4,1	28	8,3	20,8	11,1	15,3
LEVADURAS	0	12,5	8	0	28	4,1	0	0	3,8
CLADOSPORIUM	8	0	4	8,3	4	0	4,1	0	0
ALTERNARIA	0	0	0	8,3	0	0	0	3,7	0
micelia sterilia	0	4,1	0	4,1	0	0	0	0	0
ASPERGILLUS	0	4,1	0	0	4	0	0	0	0

tabla A.6.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la toma directa, final, en czapek

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	20	12,5	20	41,6	32	45,8	33,3	25,9	23
PENICILLIUM	16	16,6	4	8,3	24	20,8	20,8	7,4	11,5
CLADOSPORIUM	0	8,3	8	4,1	0	0	0	3,7	0
LEVADURAS	0	12,5	0	4,1	8	0	0	0	0
ASPERGILLUS	0	0	4	4,1	0	0	0	3,7	0

tabla A.7.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la toma directa,final,en czapek mas extracto de levadura

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	24	20,8	24	33,3	28	37,5	25	18,5	23
PENICILLIUM	12	20,8	16	20,8	36	8,3	12,5	0	3,8
LEVADURAS	8	12,5	12	0	8	4,1	4,1	0	3,8
CLADOSPORIUM	0	8,3	4	12,5	4	4,1	4,1	0	0
ALTERNARIA	0	0	4	0	0	0	0	0	0
ASPERGILLUS	0	0	0	0	4	0	0	0	0
micelia sterilia	0	0	4	0	0	0	0	0	0

tabla A.8

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados
en la dilucion -1, inicial, en agar malta

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	35,7	46,4	48,2	55,5	42,8	39,2	38,4	51,0	26,9
MONILIA	21,4	28,5	24,1	14,8	32,1	25	26,9	20,6	19,2
LEVADURAS	14,2	7,1	17,2	22,2	21,4	10,7	26,9	20,6	11,5
CLADOSPORIUM	7,1	10,7	3,4	11,1	14,2	0	3,8	17,2	15,3
ASPERGILLUS	0	3,5	3,4	3,7	10,7	7,1	0	3,4	3,8
ALTERNARIA	0	3,5	0	0	0	7,1	3,8	0	0
micelia sterilia	0	7,1	0	0	0	3,5	0	0	0

tabla A.9.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10⁻¹ , inicial, en sabouraud

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	39,2	35,7	37,9	29,6	46,4	35,7	38,4	34,4	42,3
MONILIA	14,2	17,8	24,1	25,9	25	39,2	26,9	20,6	7,6
LEVADURAS	14,2	25	20,6	25,9	14,2	10,7	15,3	20,6	0
CLADOSPORIUM	3,5	7,1	3,4	11,1	25	14,2	11,5	10,3	3
ASPERGILLUS	0	0	3,4	7,4	71	3,5	3,8	10,3	3,8
micelia sterilia	0	7,1	6,8	11,1	0	10,7	7,6	0	7,6
ALTERNARIA	0	0	0	0	0	0	3,8	6,8	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	0	0	3,8	0	3,8

tabla A.10.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-1} , inicial, en czapek

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	17,8	17,8	34,4	22,2	32,1	32,1	38,4	20,6	26,9
MONILIA	17,8	17,8	13,7	22,2	14,2	25	15,3	20,6	11,5
LEVADURAS	0	3,5	10,3	0	14,2	7,1	11,5	6,8	3,8
CLADOSPORIUM	3,5	0	0	0	3,5	0	3,8	10,3	0
ASPERGILLUS	3,5	3,5	0	0	0	7,1	0	3,4	0
ALTERNARIA	3,5	0	0	0	3,5	0	0	0	0
micelia sterilia	0	7,1	0	0	0	0	0	0	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	0	0	0	0	3,8

tabla A.11.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-1} inicial, en czapek mas extracto de levadura

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat	fresa	plat	nat	fresa	plat	nat	fresa	plat
PENICILLIUM	25	28,5	10,3	29,6	21,4	35,7	38,4	27,5	42,3
LEVADURAS	32,1	28,5	10,3	3,7	21,4	10,7	19,2	31,0	11,5
MONILIA	10,7	10,7	10,3	29,6	17,8	25	15,3	20,6	11,5
CLADOSPORIUM	7,1	3,5	0	11,1	7,1	10,7	7,6	3,4	0
micelia sterilia	0	3,5	0	0	0	3,5	0	0	0
ASPERGILLUS	0	3,5	0	3,7	7,1	0	3,8	3,4	0
ALTERNARIA	0	0	0	0	0	0	0	3,4	0

tabla A.12.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-1} final, en agar malta

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	40	41,6	20	50	44	58,3	45,8	29,6	30,7
PENICILLIUM	24	29,1	32	20,8	52	12,5	45,8	48,1	30,7
LEVADURAS	8	25	8	16,6	24	8,3	4,1	3,7	3,8
CLADOSPORIUM	16	12,5	0	8,3	4	0	4,1	3,7	3,8
ASPERGILLUS	0	4,1	0	0	8	0	0	0	3,8
micelia sterilia	0	4,1	0	0	0	0	0	7,4	0
ALTERNARIA	0	0	0	0	0	0	0	3,7	0

tabla A.13.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-1} final, en sabouraud

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILIUM	36	33,3	28	33,3	36	12	37,5	40,7	23,0
MONILIA	32	25	40	29,1	32	54,1	41,6	29,6	30,7
LEVADURAS	24	12,5	16	16,6	20	25	12,5	18,5	7,6
CLADOSPORIUM	4	4,1	0	12,5	4	12,5	0	0	0
micelia sterilia	0	8,3	0	4,1	4	0	0	0	0
ALTERNARIA	4	0	0	0	0	0	0	3,7	0
ASPERGILLUS	0	0	0	4,1	0	0	0	0	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	0	0	0	3,7	0

tabla A.14.



tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-1} final, en czapek

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	20	25	28	33,3	16	33,3	37,5	25,9	26,9
PENICILLIUM	16	20,8	16	20,8	28	12	33,3	22,2	34,6
LEVADURAS	4	4,1	4	0	4	4,1	4,1	0	3,8
CLADOSPORIUM	0	0	8	0	0	4,1	0	0	0
micelia sterilia	0	0	0	0	0	0	0	0	3,8

tabla A.15.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-1} final, en czapek mas extracto de levadura

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	16	37,5	12	50	40	50	41,6	25,9	26,9
PENICILLIUM	40	20,8	16	16,6	20	20,8	16,6	33,3	11,5
LEVADURAS	32	37,5	24	16,6	24	12,5	8,3	7,4	23
CLADOSPORIUM	4	4,1	0	8,3	4	12,5	4,1	3,7	7,6
ALTERNARIA	0	0	0	4,1	0	0	0	0	7,6
ASPERGILLUS	4	0	0	0	4	0	0	0	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	0	4,1	0	0	0

tabla A.16.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-2} , inicial, en agar malta

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	28,5	32,1	39,2	40,7	35,7	32,1	38,4	27,5	26,9
MONILIA	32,1	25,0	17,8	33,3	28,5	39,2	19,2	24,1	23,0
LEVADURAS	3,5	21,4	14,2	22,2	10,7	14,2	15,3	6,8	3,8
CLADOSPORIUM	14,2	14,2	3,5	11,1	7,1	7,1	7,6	3,4	7,6
ASPERGILLUS	3,5	3,5	7,1	0	0	7,1	0	0	3,8
micelia sterilia	7,1	10,7	3,5	0	0	3,5	0	0	0
ALTERNARIA	3,5	0	0	3,7	0	0	0	0	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	0	0	3,8	0	0

tabla A.17.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-2} inicial en sabouraud

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	25	28,5	39,2	29,6	28,5	21,4	42,3	24,1	42,3
MONILIA	17,8	14,2	14,2	14,8	17,8	32,1	19,2	20,6	15,3
LEVADURAS	17,8	10,7	21,4	22,2	10,7	3,5	7,6	17,2	3,8
CLADOSPORIUM	3,5	3,5	3,5	0	7,1	0	0	6,8	7,6
ASPERGILLUS	0	0	0	7,4	7,1	3,5	0	6,8	3,8
micelia sterilia	3,5	7,1	0	3,7	0	7,1	0	0	0
ALTERNARIA	0	0	0	0	3,8	0	0	0	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	0	0	0	0	3,8

tabla A.18.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-2} inicial, en czapek

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	25	28,5	25	22,2	25	28,5	35,7	17,2	23,0
MONILIA	14,2	17,8	7,1	11,1	10,7	32,1	23	17,2	15,3
LEVADURAS	0	10,7	7,1	3,7	7,1	0	3,8	3,4	0
ASPERGILLUS	7,1	3,5	10,7	3,7	0	3,5	0	0	3,8
CLADOSPORIUM	3,5	0	0	3,7	3,5	3,5	3,8	3,4	0
micelia sterilia	0	3,5	0	3,7	0	0	0	0	0

tabla A.19.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-2} inicial en czapek mas extracto de levadura

193

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
PENICILLIUM	28,5	14,2	32,1	11,1	28,5	17,8	50	27,5	19,2
LEVADURAS	28,5	21,4	17,8	18,5	17,8	17,8	23	17,2	23
MONILIA	17,8	10,7	25	14,8	17,8	25	19,2	20,6	15,3
CLADOSPORIUM	7,1	7,1	0	3,7	3,5	7,1	3,8	10,3	11,5
micelia sterilia	3,5	0	3,5	3,7	0	3,5	0	0	0
RHIZOPUS	0	0	0	0	3,5	0	0	3,4	0
ALTERNARIA	0	0	0	0	0	0	3,8	0	0
ASPERGILLUS	0	0	0	0	3,5	0	0	0	0

tabla A. 20.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-2} final ,en agar malta

marcas y sabores generos	A			3			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	28	37,5	36	50	40	45,8	37,5	25,9	30,7
PENICILLIUM	36	20,8	20	25	20	20,8	41,6	44,4	34,6
LEVADURAS	16	8,3	0	20,8	8	8,3	12,5	3,7	11,5
CLADOSPORIUM	0	8,3	0	0	8	8,3	8,3	0	7,6
ASPERGILLUS	0	0	0	4,1	4	0	8,3	0	0
micelia sterilia	0	4,1	8	0	0	0	4,1	0	0
RHIZOPUS	4	0	0	4,1	0	0	0	0	0
ALTERNARIA	0	0	0	4,1	0	0	0	3,7	0

tabla A.21.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-2} , final, en sabouraud

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	40	16,6	24	50	48	41,6	37,5	29,6	26,9
PENICILLIUM	20	45,8	8	26	20	12,5	33,3	33,3	26,9
LEVADURAS	8	16,6	16	16,6	12	12,5	0	0	3,8
CLADOSPORIUM	4	4,1	0	0	8	4,1	0	7,4	3,8
ASPERGILLUS	0	0	8	0	0	4,1	0	0	0
micelia sterilia	0	4,1	0	4,1	0	0	0	0	0

tabla A.22.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-2} final, en czapek

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa.	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	24	25	16	33,3	32	20,8	37,5	22,2	23
PENICILLIUM	20	8,3	16	8,3	16	4,1	29,1	33,3	30,7
LEVADURAS	8	8,3	0	4,1	8	0	0	0	0
ASPERGILLUS	0	0	0	4,1	0	0	0	0	3,8
ALTERNARIA	0	0	0	4,1	0	0	0	3,7	0
micelia sterilia	4	0	0	0	0	0	0	0	0
CLADOSPORIUM	0	0	0	0	0	0	0	0	3,8

tabla A.23.

tabla de frecuencias de cada uno de los generos encontrados en la dilucion 10^{-2} final, en czapek mas extracto de levadura

marcas y sabores generos	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
MONILIA	20	37,5	24	45,8	44	45,8	37,5	29,6	26,9
PENICILLIUM	20	20,8	16	29,1	24	8,3	37,5	29,9	23
LEVADURAS	48	25	16	8,3	24	12,5	4,1	11,1	7,6
CLADOSPORIUM	4	0	20	4,1	8	8,3	8,3	3,7	3,8
ASPERGILLUS	0	0	4	4,1	0	0	4,1	0	0
ALTERNARIA	0	4,1	0	0	0	0	0	0	3,8
micelia sterilia	0	0	0	0	0	0	0	3,7	0

tabla A.24.

V.2.2. Recuento de unidades formadoras de colonias

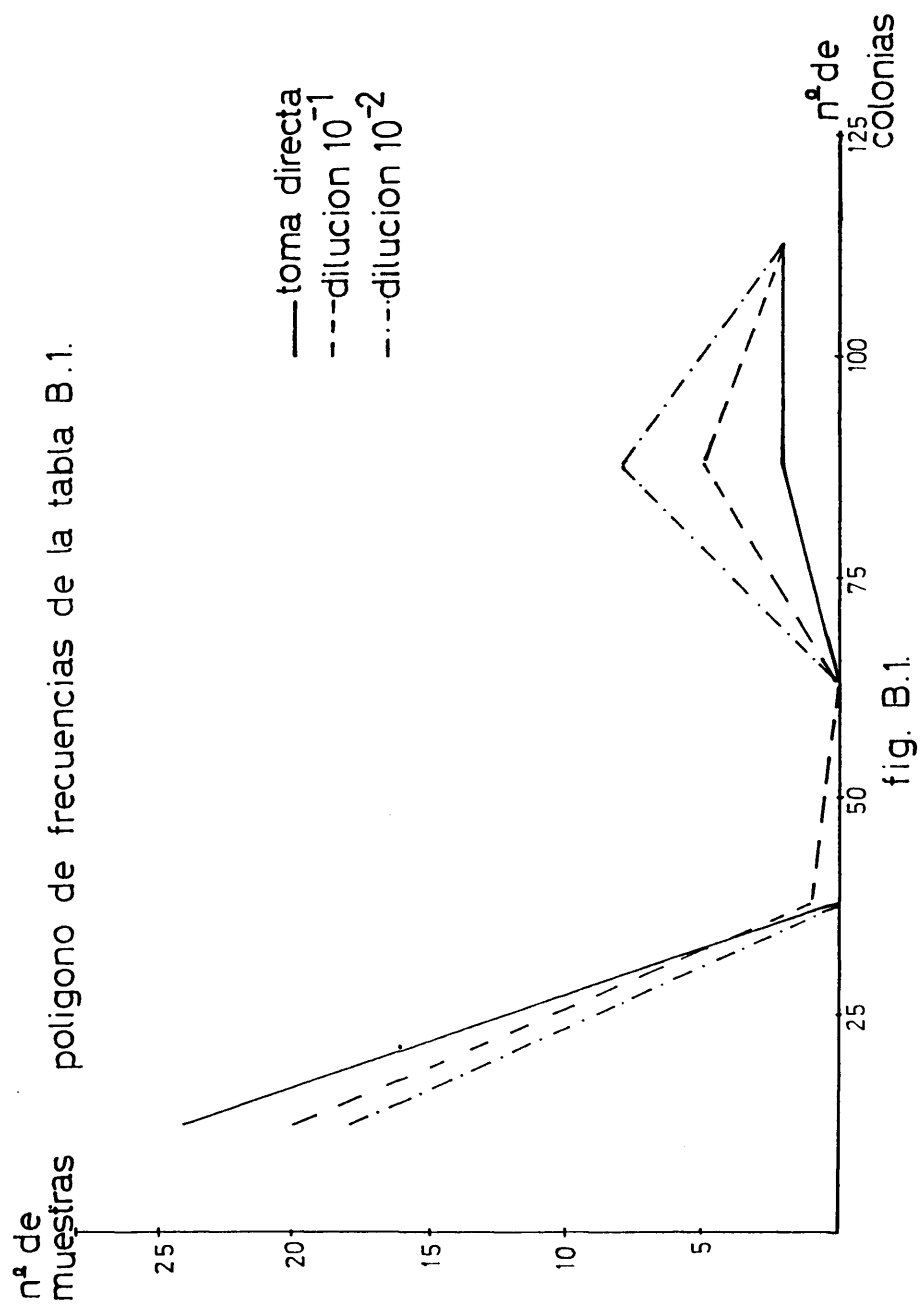
Dado que la bibliografía en este aspecto es muy controvertida, nosotros quisimos comprobar la posibilidad del recuento del número de colonias totales aisladas en cada uno de los medios y para cada una de las diluciones, sirviéndonos para esta experiencia de las muestras analizadas de la marca A.

Estos resultados vienen reflejados por las tablas de la B1 a la B.24 y sus polígonos de frecuencia figs 1 a las 24.

U.F.C. totales /c.c. | natural
 inicial
 agar malta

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	1	3	3
2	0	0	2
3	0	0	0
4	1	0	0
5	8	10	100
6	2	8	9
7	1	4	0
8	0	0	5
9	0	0	0
10	105	0	100
11	0	0	0
12	100	101	100
13	104	101	2
14	100	100	100
15	0	0	1
16	2	1	1
17	11	100	118
18	1	2	100
19	0	19	0
20	1	38	0
21	1	100	0
22	0	100	101
23	0	100	100
24	0	2	100
25	0	1	0
26	0	2	0
27	2	0	4
28	0	0	100
totales	440	792	1046

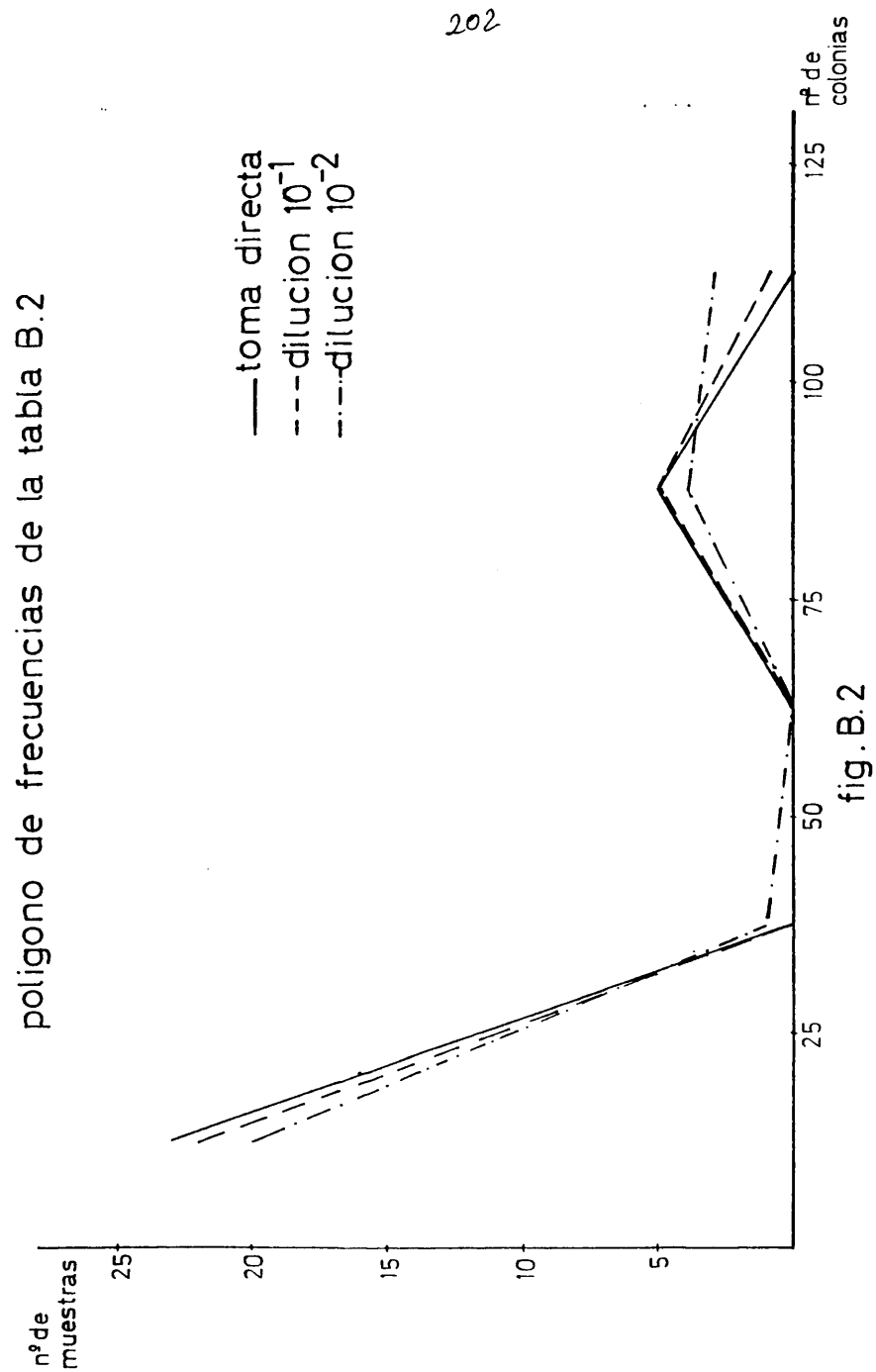
tabla B.1.



U.F.C. totales/cc. | natural
| inicial
| sabouraud

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	2	96	1
2	1	1	1
3	3	0	0
4	1	1	0
5	5	4	4
6	0	5	2
7	1	100	2
8	0	1	0
9	0	1	0
10	100	2	101
11	0	1	0
12	100	1	100
13	1	102	101
14	0	100	101
15	100	2	1
16	100	0	0
17	1	100	50
18	1	0	100
19	0	2	0
20	100	4	0
21	2	0	100
22	7	17	4
23	0	100	100
24	4	5	3
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	1	0
28	0	1	1
totales	529	647	772

tabla B.2



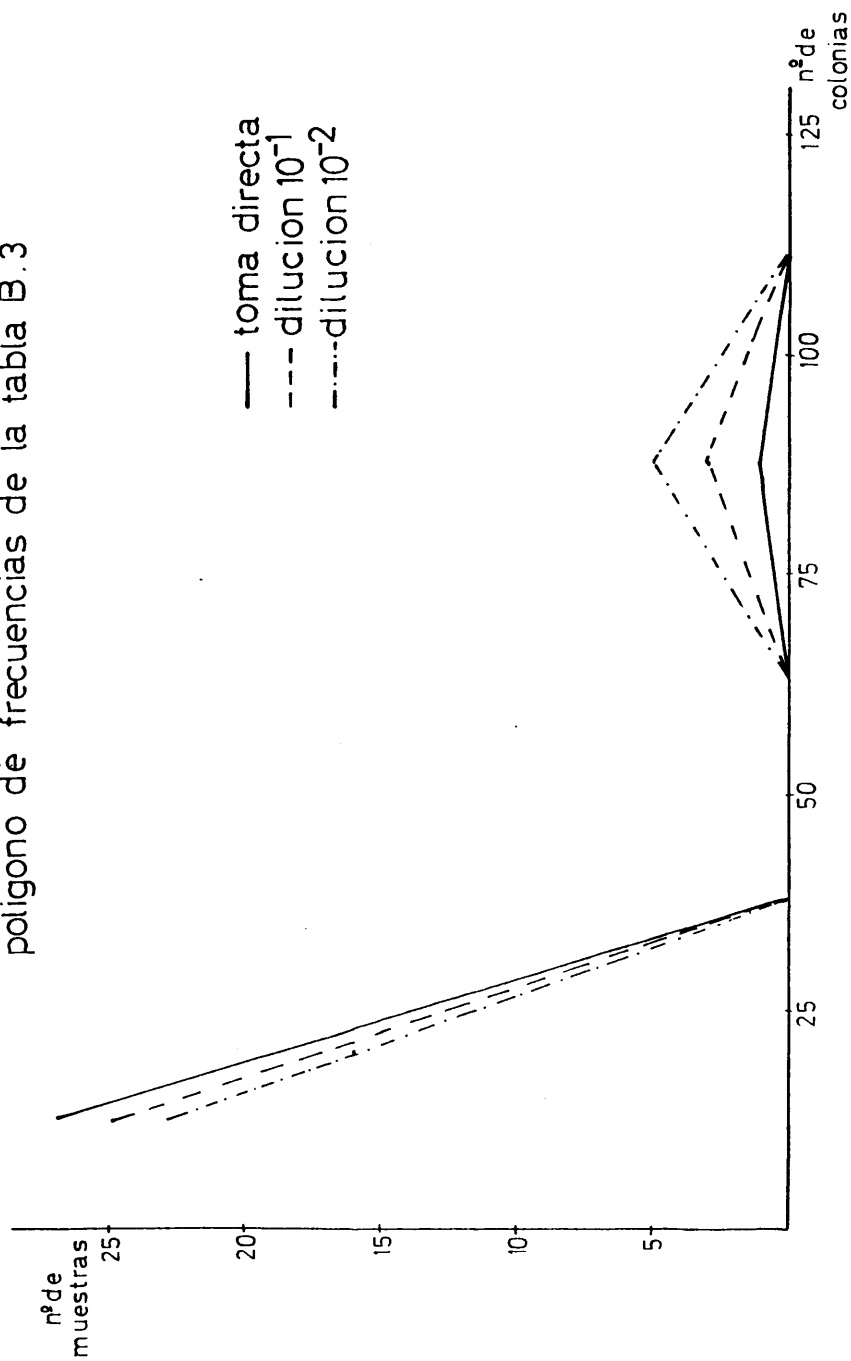
U.F.C. totales/cc

natural
inicial
czapek

muestras	t. d.	10 ⁻¹	10 ⁻²
1	18	0	0
2	0	0	0
3	100	0	0
4	0	0	0
5	1	6	11
6	0	4	4
7	0	0	2
8	1	0	2
9	3	0	4
10	0	100	1
11	22	0	0
12	0	0	1
13	1	100	100
14	0	0	100
15	0	1	2
16	0	0	0
17	0	100	0
18	0	100	0
19	9	1	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	100	100
23	0	0	2
24	3	5	0
25	0	0	0
26	0	1	0
27	0	1	1
28	0	0	0
totales	158	519	328

tabla B.3

poligono de frecuencias de la tabla B.3



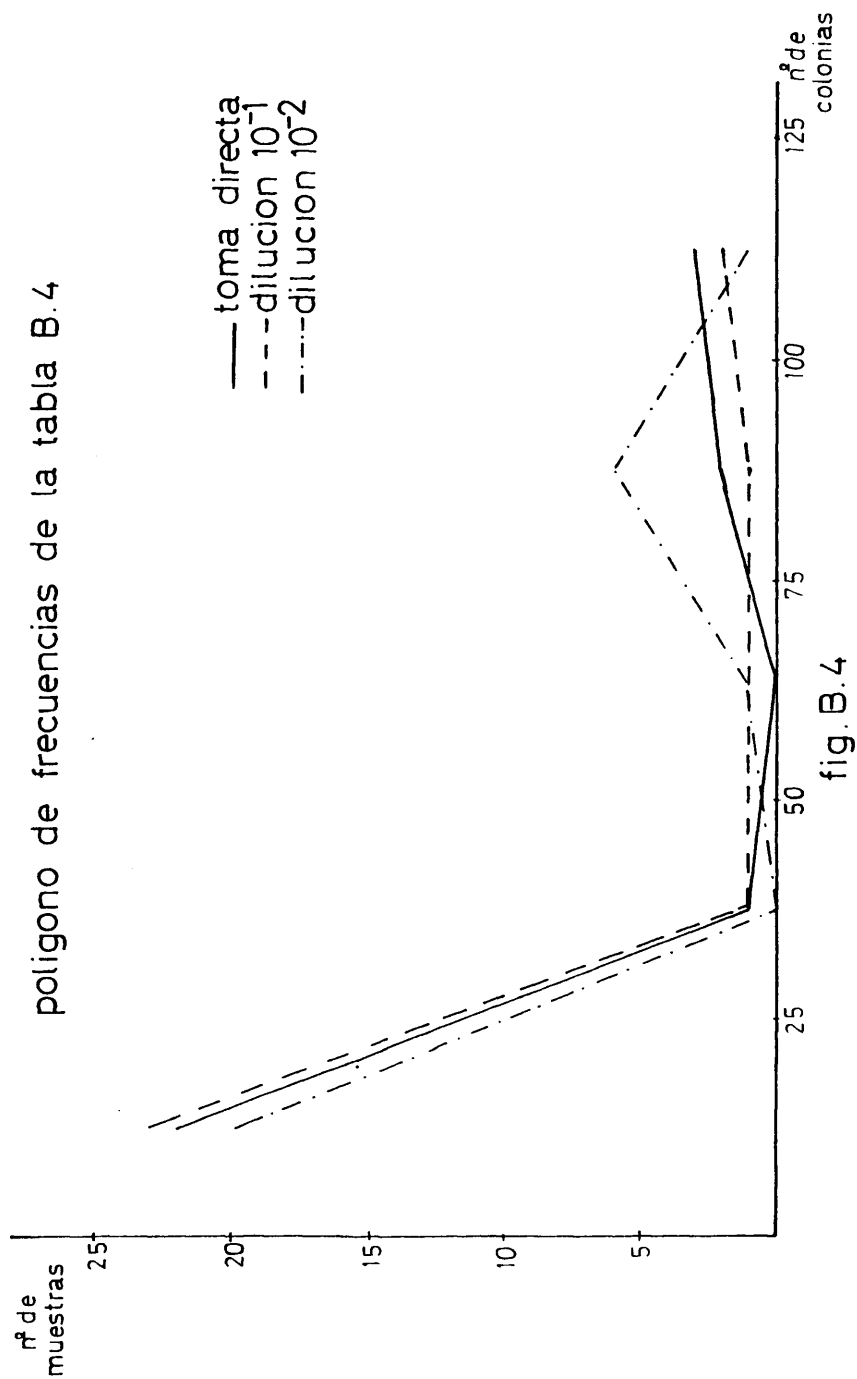
205

U.F.C. totales/cc

natural
inicial
czapek mas E.L.

muestras	t. d.	10 ⁻¹	10 ⁻²
1	100	120	25
2	0	0	2
3	1	0	1
4	1	14	0
5	3	8	100
6	2	16	20
7	1	2	3
8	0	0	100
9	0	1	0
10	0	0	100
11	1	0	1
12	103	102	1
13	101	1	2
14	0	100	100
15	0	2	2
16	0	5	101
17	4	0	100
18	102	0	0
19	2	566	1
20	26	16	6
21	1	18	52
22	100	1	0
23	2	0	2
24	0	0	100
25	0	39	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	2	0	0
totales	552	502	819

tabla B.4

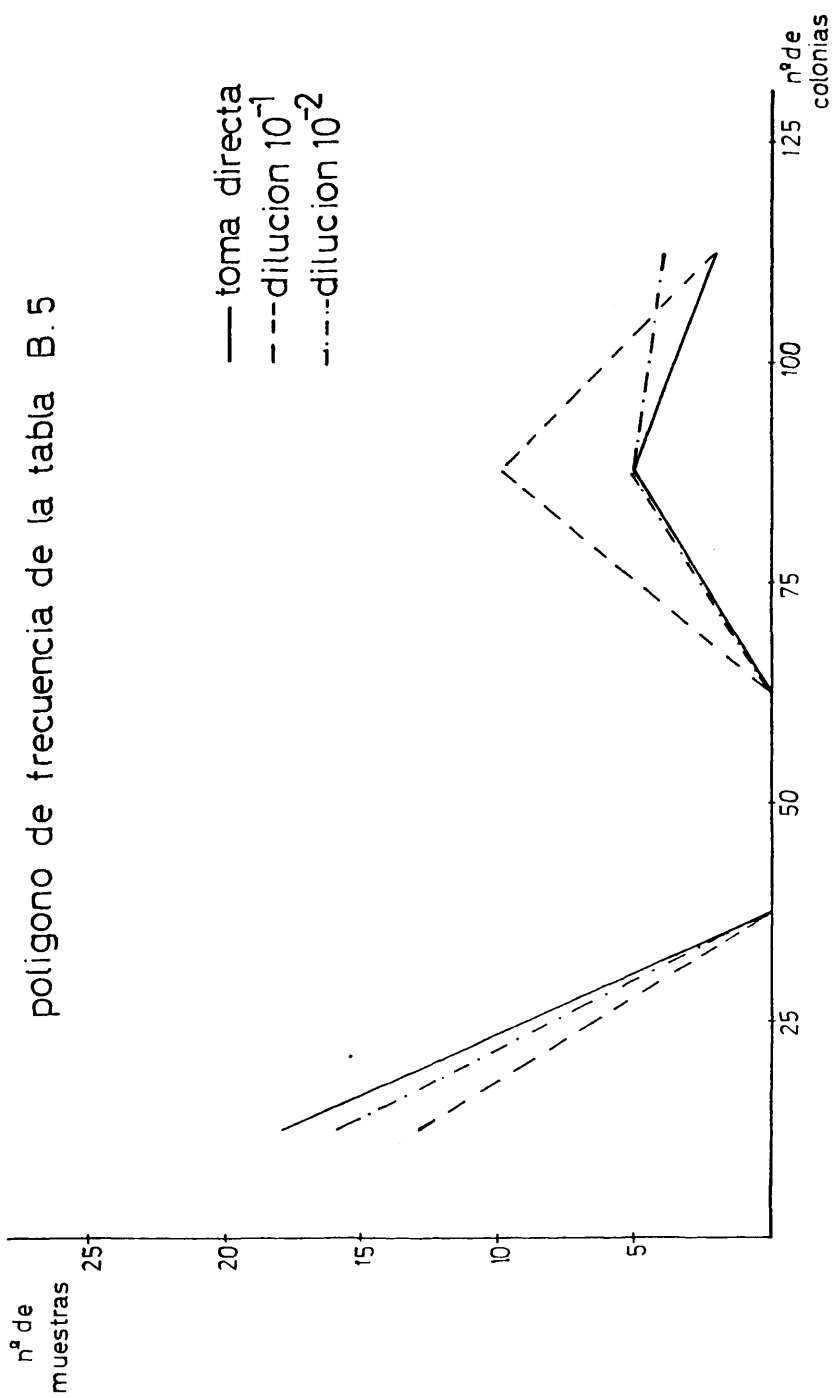


201

U.F.C. totales/cc natural
final
agar malta

muestras	t. d.	10^{-1}	10^{-2}
1	1	5	1
2	6	6	13
3	0	0	2
4	1	8	1
5	1	0	0
6	0	0	0
7	0	1	102
8	4	0	123
9	100	100	100
10	0	0	2
11	0	5	9
12	0	0	3
13	2	0	0
14	100	102	125
15	111	100	0
16	101	101	100
17	0	100	2
18	0	100	2
19	0	100	0
20	1	100	100
21	1	1	0
22	100	100	110
23	100	100	100
24	0	0	3
25	100	100	100
totales	729	1229	998

tabla B. 5

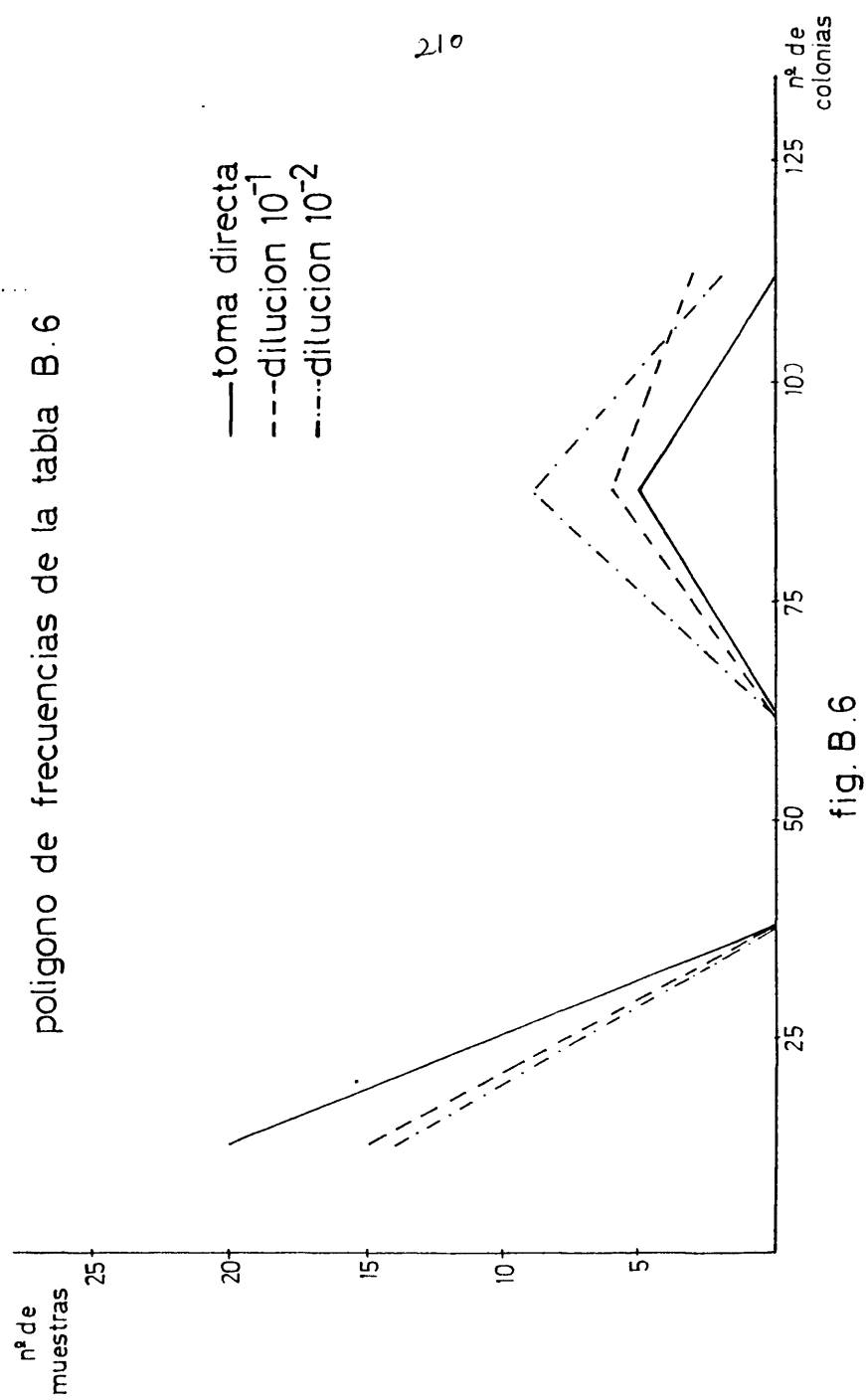


U.F.C. totales/cc

natural
final
sabouraud

muestras	t. d.	10^{-1}	10^{-1}
1	1	0	0
2	2	2	14
3	0	0	0
4	2	1	1
5	0	0	0
6	0	0	0
7	1	2	100
8	0	1	100
9	100	105	100
10	4	1	100
11	1	101	16
12	0	0	0
13	1	100	0
14	100	102	100
15	2	0	100
16	100	125	101
17	0	100	0
18	100	100	1
19	0	21	0
20	0	100	100
21	0	3	0
22	0	4	102
23	0	100	100
24	100	100	100
25	0	0	1
totales	514	1.064	1.136

tabla B.6

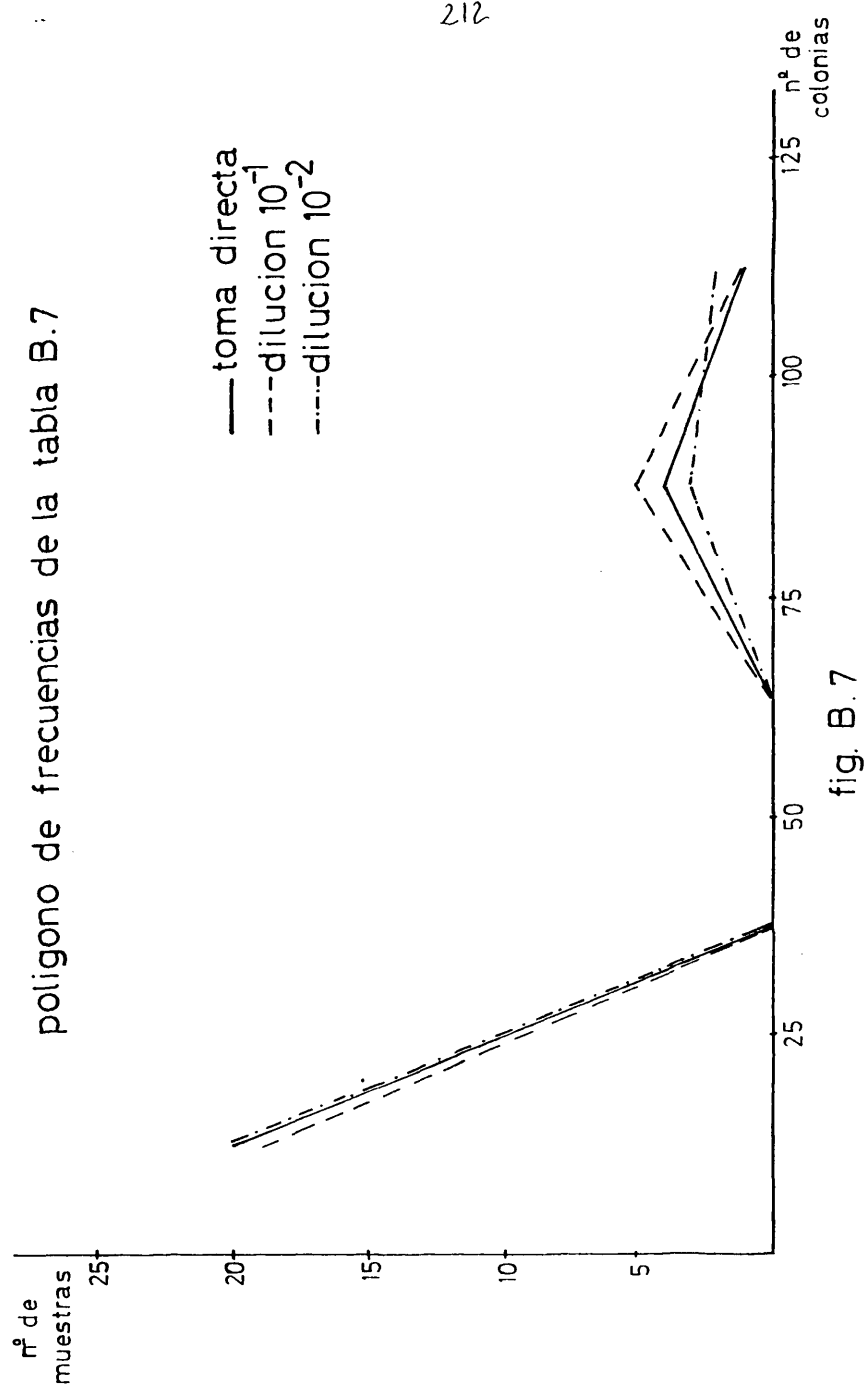


U.F.C. totales/cc

natural
final
czapek

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	3	0	0
2	5	2	1
3	0	0	0
4	0	4	11
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	100	100
8	0	0	100
9	0	0	0
10	101	101	101
11	0	0	2
12	0	0	0
13	1	100	0
14	100	2	102
15	100	0	0
16	100	100	100
17	1	0	1
18	0	100	0
19	0	0	1
20	0	0	0
21	0	5	1
22	0	0	2
23	100	0	0
24	0	0	0
25	0	100	0
totales	511	614	522

tabla B.7

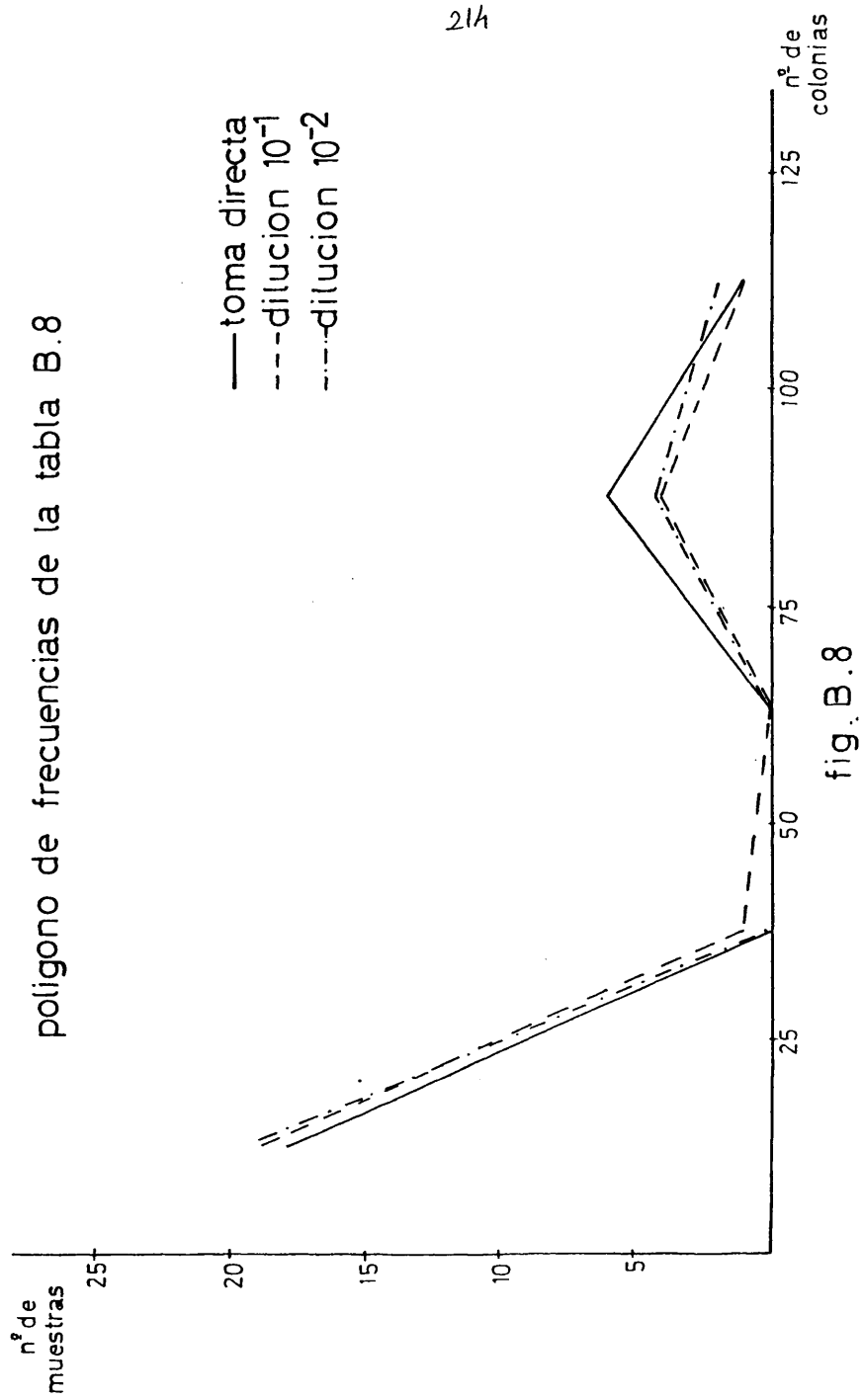


U.F.C. totales/cc

natural
final
czapek mas E.L.

muestras	t. d.	10^{-1}	10^{-2}
1	0	1	2
2	2	2	10
3	4	0	1
4	0	12	7
5	0	0	0
6	0	2	0
7	1	5	100
8	0	1	3
9	100	0	100
10	1	6	5
11	0	100	102
12	0	6	1
13	100	125	4
14	0	0	103
15	103	1	0
16	0	100	1
17	0	1	100
18	0	43	0
19	0	2	13
20	0	100	100
21	0	1	0
22	100	13	7
23	100	0	0
24	100	1	24
25	100	100	4
totales	711	622	687

tabla B.8



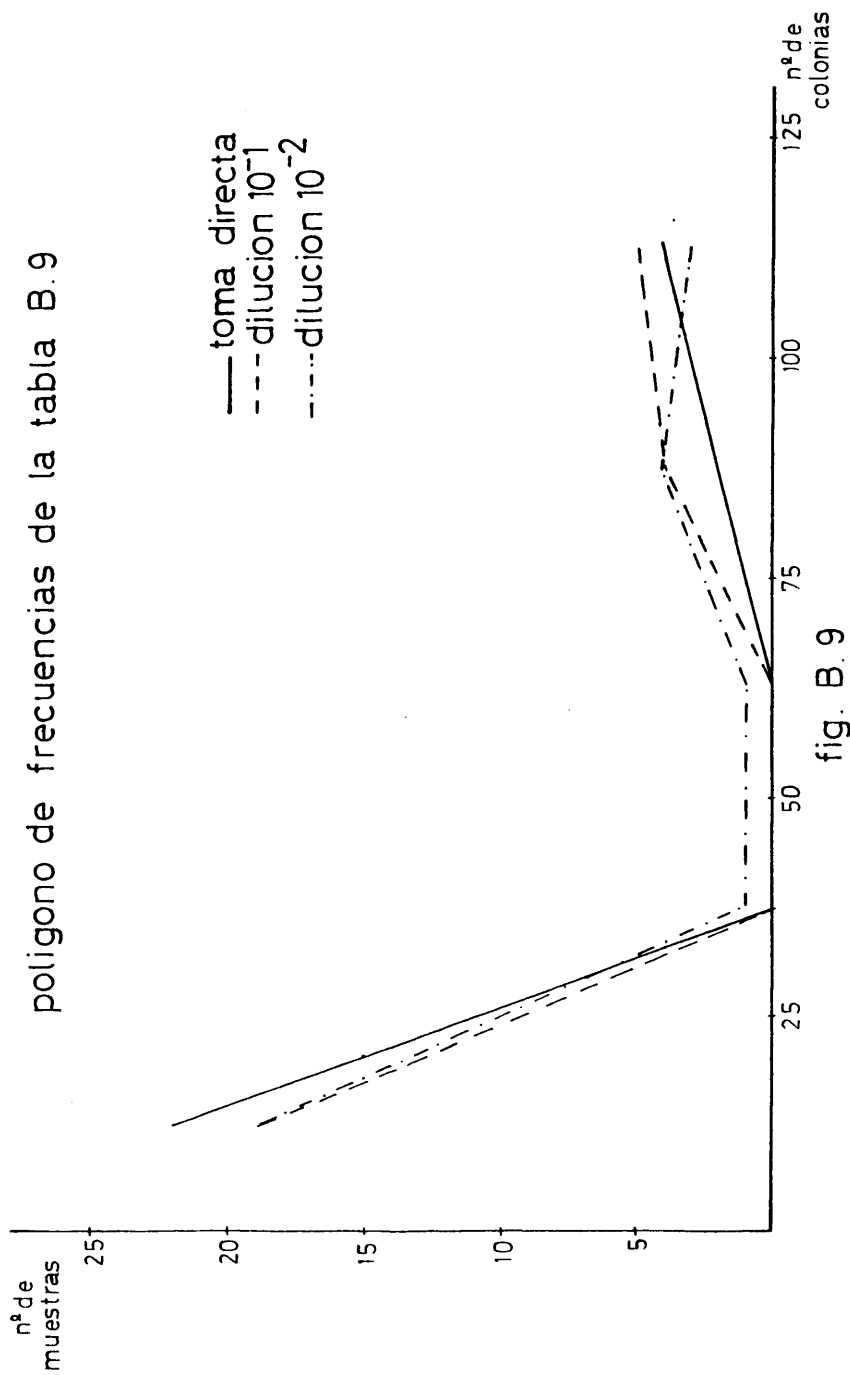
215

U.F.C. totales/cc

fresa
inicial
agar malta

muestras	t. d.	10 ⁻¹	10 ⁻²
1	2	8	4
2	24	3	10
3	0	0	0
4	0	0	0
5	2	2	4
6	2	2	1
7	5	1	9
8	0	2	1
9	1	0	100
10	0	0	0
11	100	100	100
12	101	125	103
13	110	2	0
14	3	3	0
15	3	108	1
16	1	1	4
17	100	105	100
18	1	100	25
19	0	1	0
20	101	101	9
21	101	0	125
22	0	101	65
23	0	1	2
24	0	100	100
25	0	100	50
26	0	0	0
27	0	0	1
28	0	4	0
totales	657	973	910

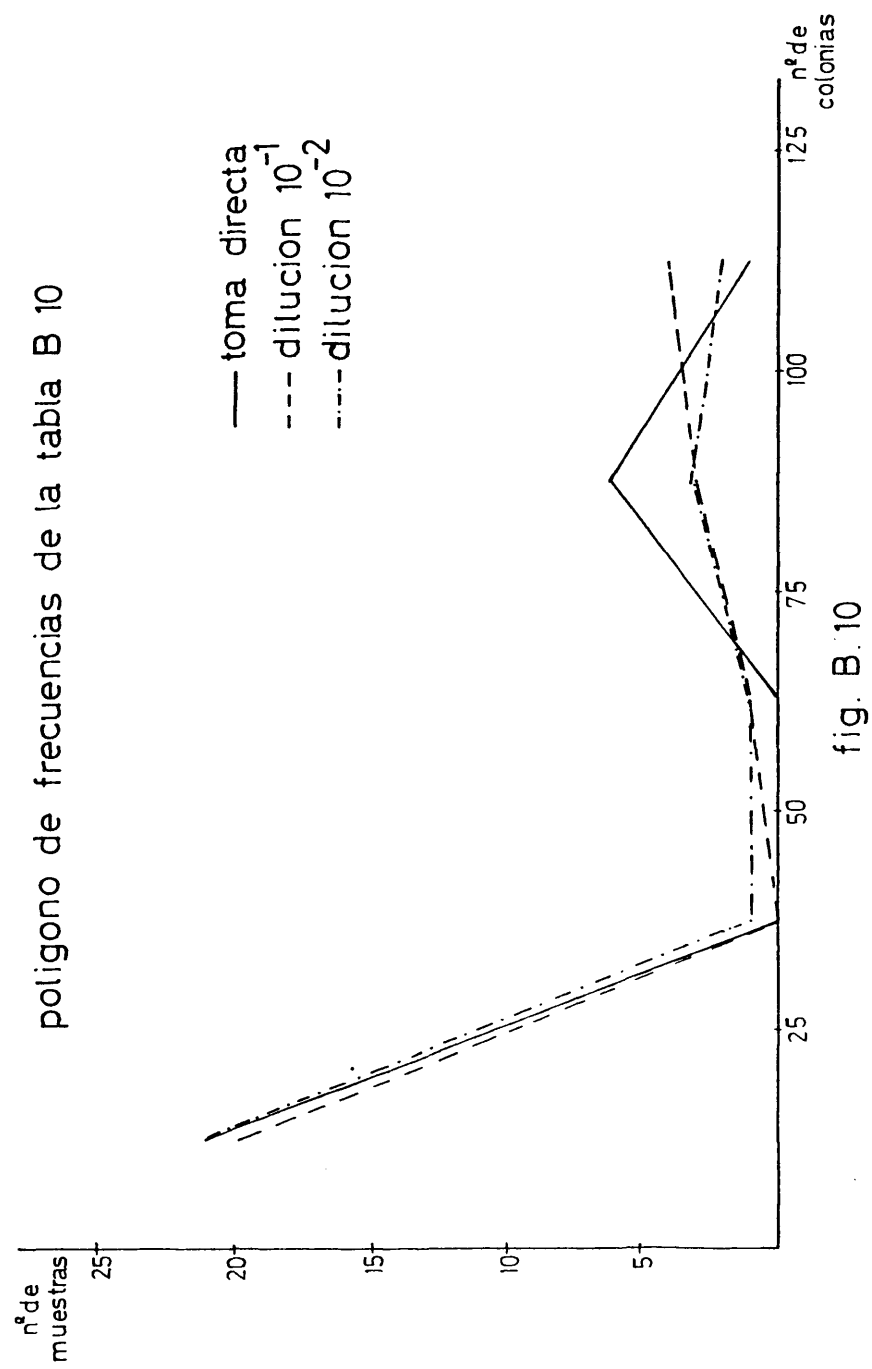
tabla B.9



UFC. totales/cc fresa
 inicial
 sabouraud

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	3	54	89
2	14	3	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	1	3	0
6	0	4	1
7	8	5	0
8	0	0	0
9	0	1	0
10	100	0	0
11	100	100	0
12	100	125	102
13	1	2	1
14	100	101	3
15	0	0	0
16	0	1	0
17	100	101	100
18	125	0	101
19	0	1	50
20	100	3	51
21	1	0	0
22	0	102	0
23	0	1	3
24	0	2	3
26	1	100	100
26	0	0	0
27	0	1	1
28	0	100	0
totales	754	810	605

tabla B.10

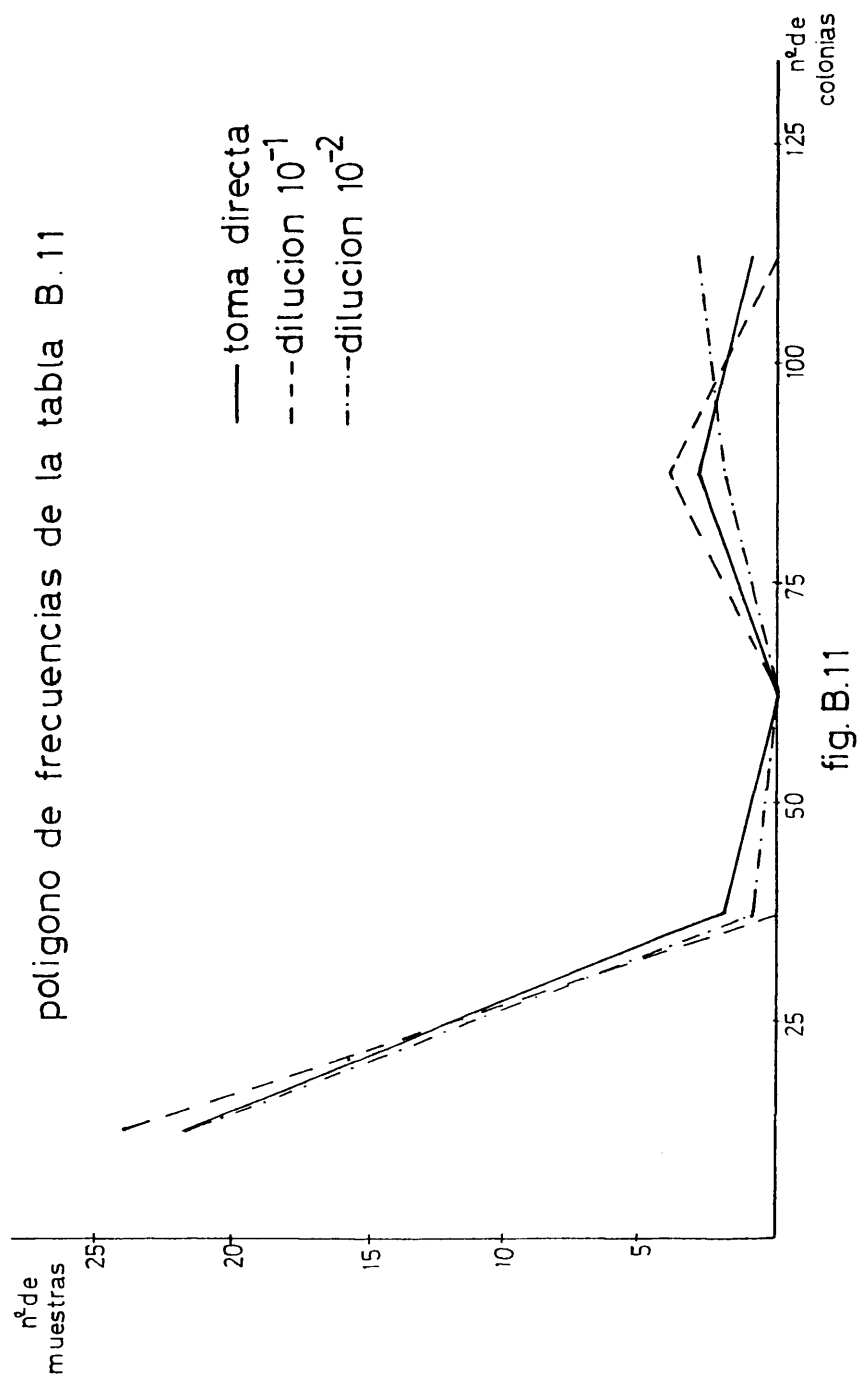


UFC. totales

fresa
inicial
czapek

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	31	0	2
2	39	2	39
3	0	0	3
4	1	0	0
5	0	2	5
6	0	0	1
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	100	0	101
12	10	3	3
13	100	3	2
14	100	100	0
15	4	2	0
16	0	2	0
17	102	100	101
18	0	0	101
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	100
22	0	0	0
23	0	4	0
24	0	0	100
25	0	1	2
26	0	0	0
27	1	100	0
28	2	100	0
totales	4 8 1	420	560

tabla B. 11



UFC. totales/cc

fresa
inicial
czapek mas E.L.

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	0	125	125
2	29	0	0
3	0	4	0
4	100	100	9
5	2	6	3
6	1	12	14
7	0	12	0
8	0	0	0
9	1	1	0
10	0	0	0
11	3	1	0
12	100	2	12
13	0	105	0
14	0	0	1
15	0	100	0
16	1	0	0
17	101	0	103
18	100	0	100
19	0	0	0
20	100	100	8
21	100	0	100
22	100	6	0
23	0	0	3
24	2	2	100
25	0	2	0
26	0	0	0
27	0	2	1
28	1	1	0
totales	651	575	566

tabla B.12

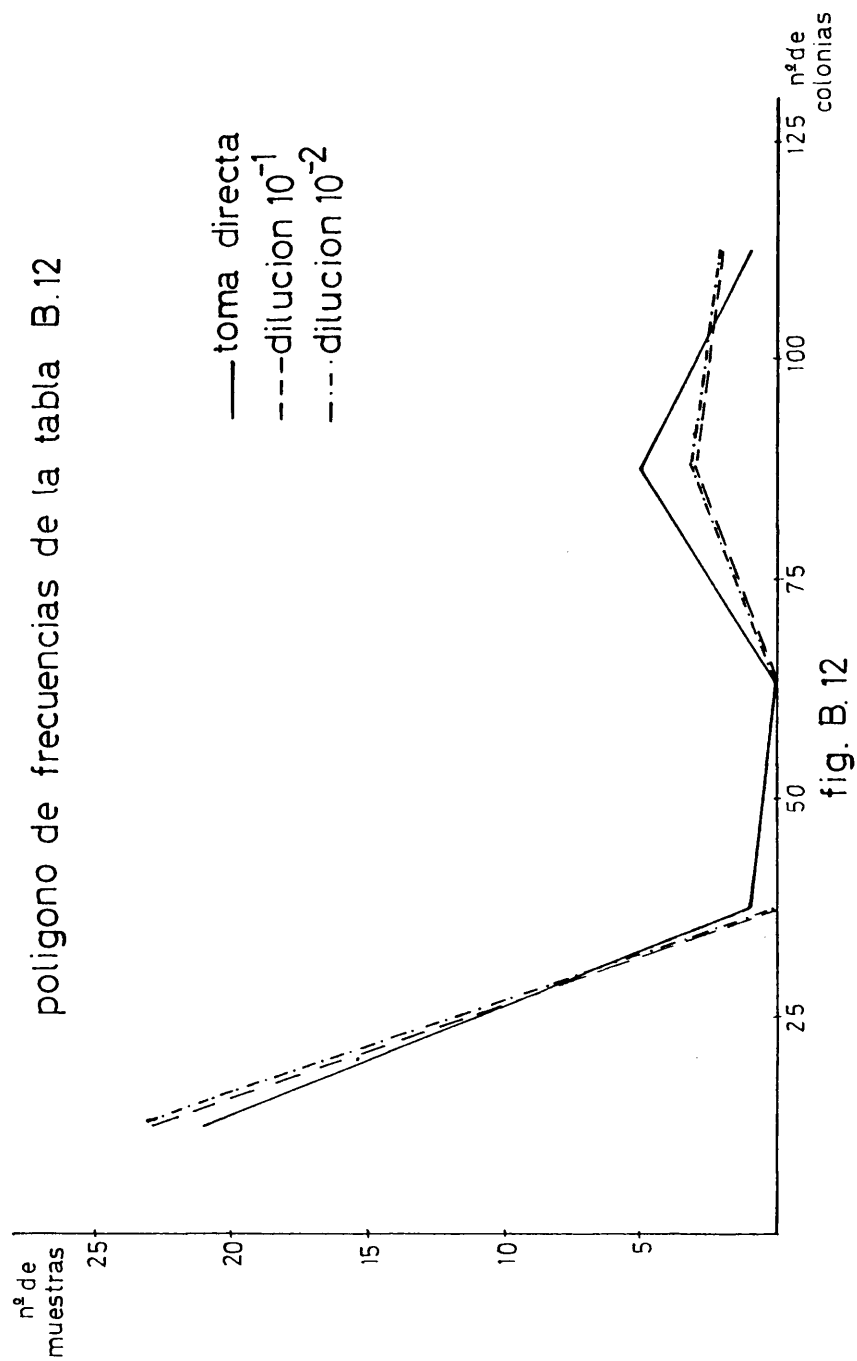
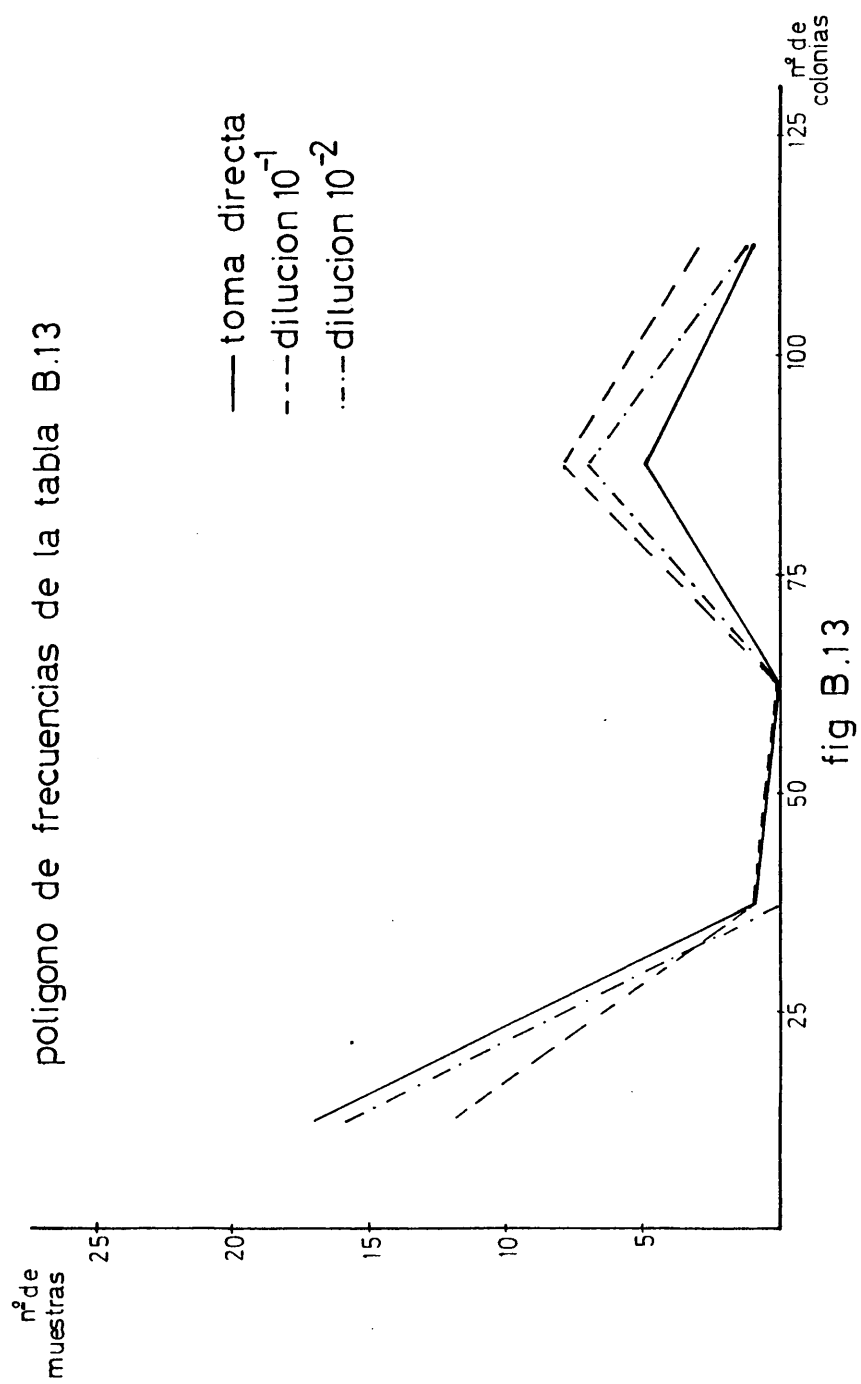


fig. B.12

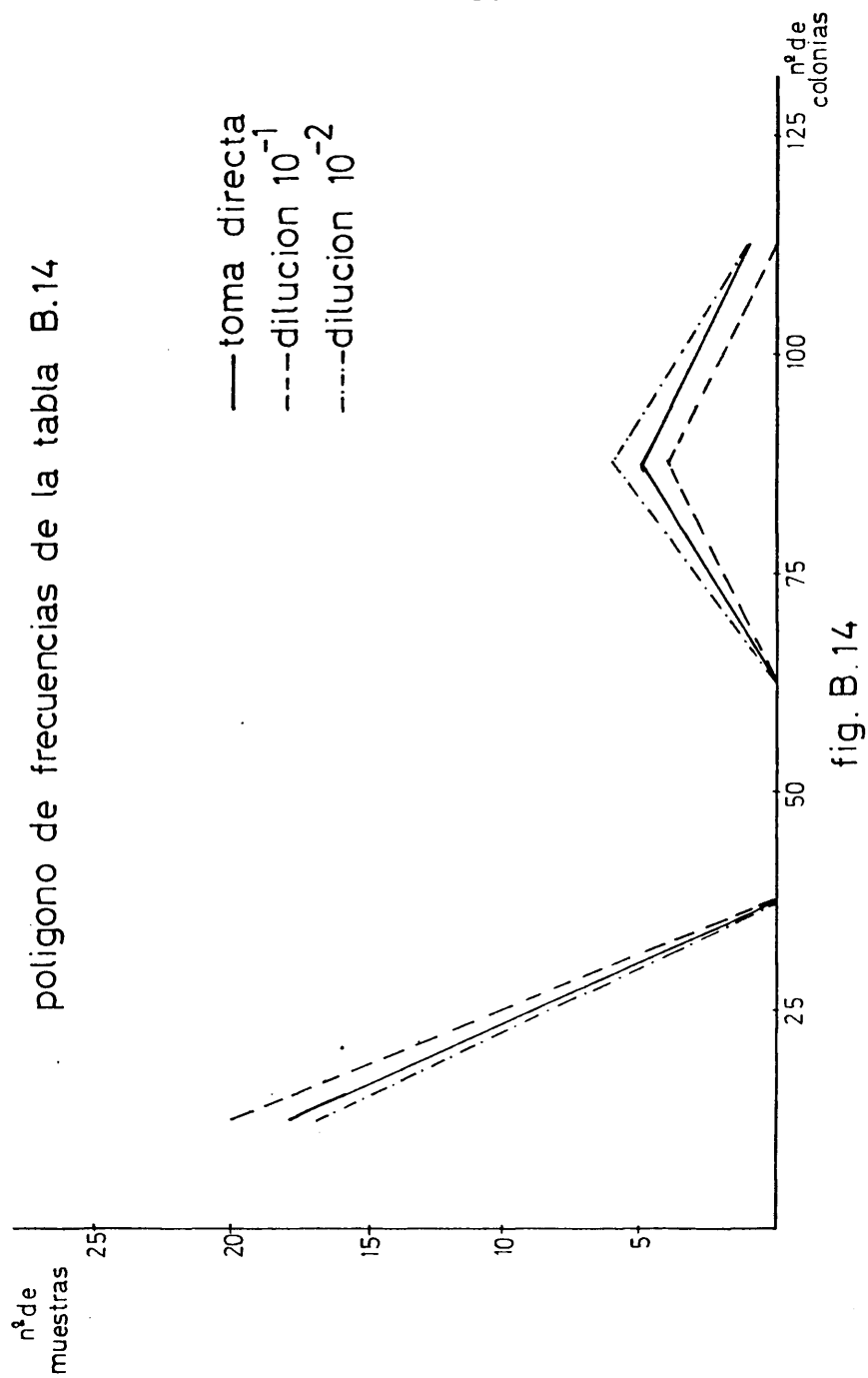
U.F.C. totales/cc		fresa final	agar malta
muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	3	2	1
2	0	26	22
3	1	1	0
4	2	0	0
5	1	4	3
6	0	0	2
7	100	101	1
8	100	100	100
9	100	125	0
10	0	100	100
11	1	2	0
12	51	100	0
13	100	2	100
14	102	100	125
15	0	100	1
16	0	4	100
17	1	6	2
18	0	1	2
19	0	5	2
20	0	2	0
21	0	100	100
22	0	100	100
23	100	103	0
24	0	100	100
totales	682	11 84	8 61

tabla B.13



U.F.C. totales/cc		fresa final sabouraud	
muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	5	1	0
2	15	3	13
3	0	0	2
4	1	5	4
5	3	3	2
6	8	1	1
7	100	100	0
8	100	0	2
9	3	1	100
10	0	0	100
11	0	2	3
12	0	0	1
13	3	2	0
14	100	100	102
15	0	5	2
16	0	22	100
17	0	1	2
18	0	0	0
19	5	4	4
20	0	0	100
21	100	100	3
22	0	0	0
23	100	0	100
24	101	1	100
totales	644	451	741

tabla B.14



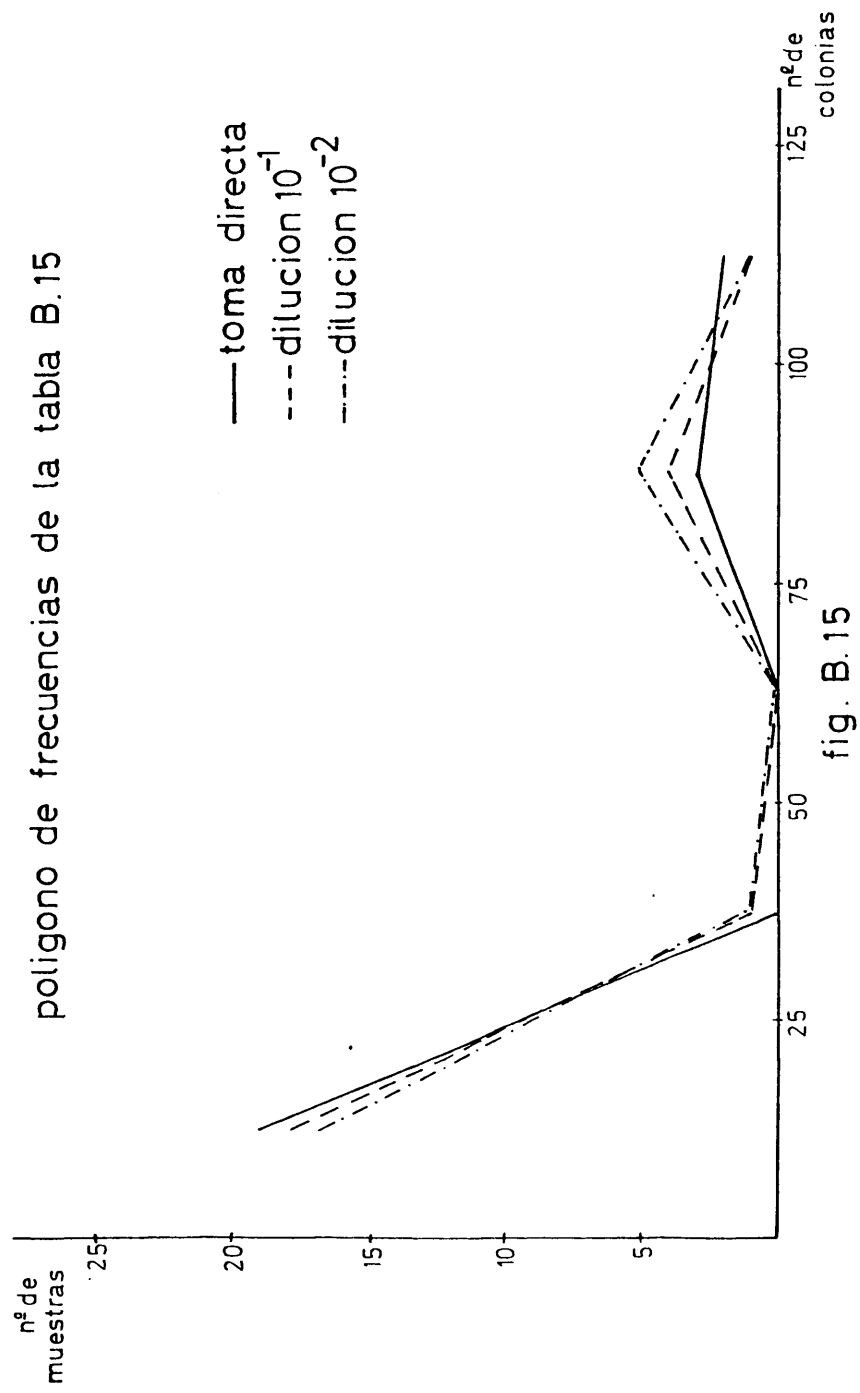
U.F.C. totales/cc

227

fresa
final
czapek

muestras	t. d.	10 ⁻¹	10 ⁻²
1	0	0	0
2	0	0	40
3	1	0	0
4	0	1	0
5	2	1	1
6	3	2	0
7	102	100	100
8	0	100	100
9	1	101	100
10	3	0	0
11	0	0	0
12	100	0	100
13	0	0	0
14	102	100	107
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	1	0
18	0	0	0
19	0	4	0
20	100	29	13
21	0	0	0
22	0	100	0
23	100	0	100
24	0	0	0
totales	514	539	661

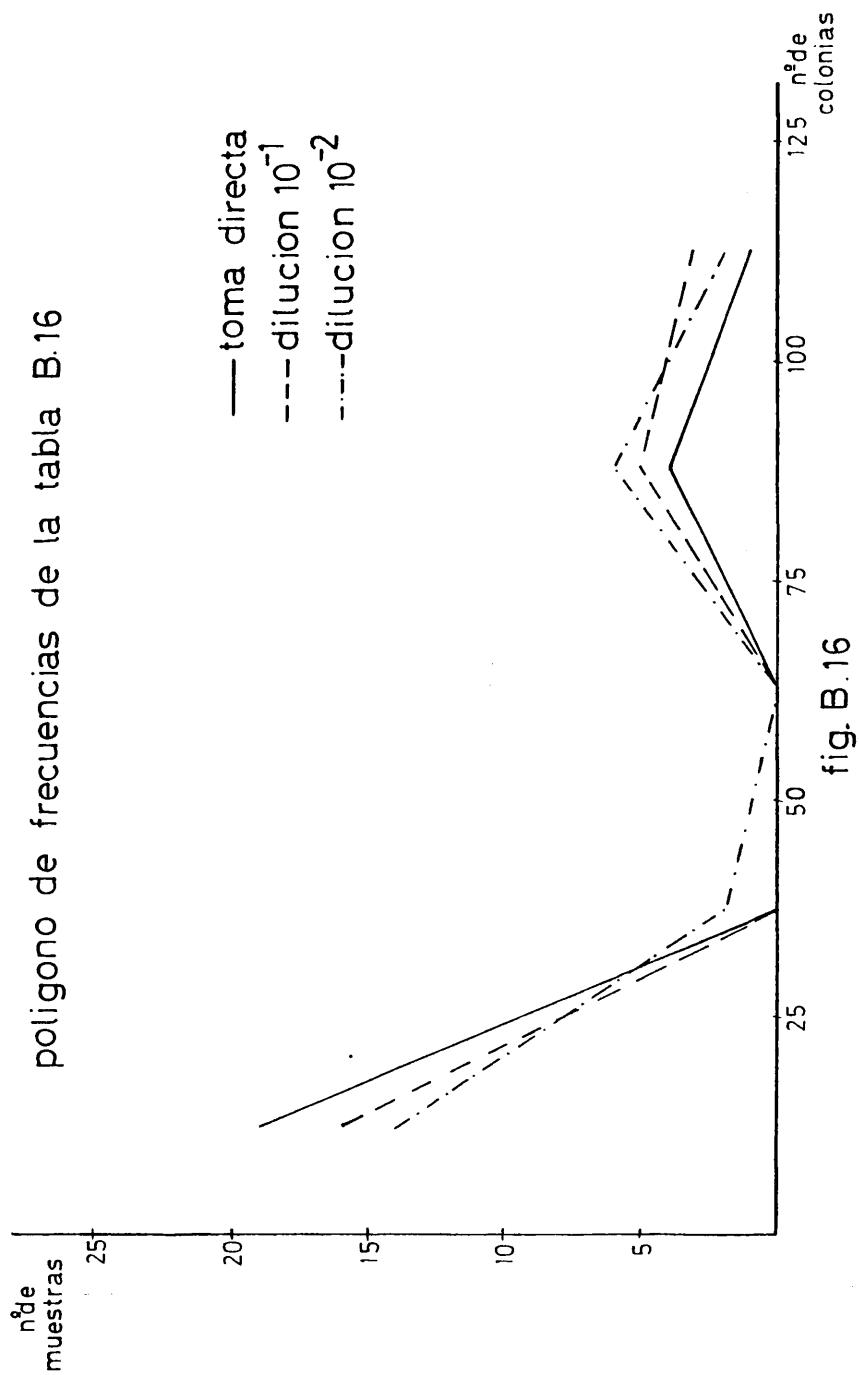
tabla B.15



UFC totales/cc fresa
final
czapek mas E.L.

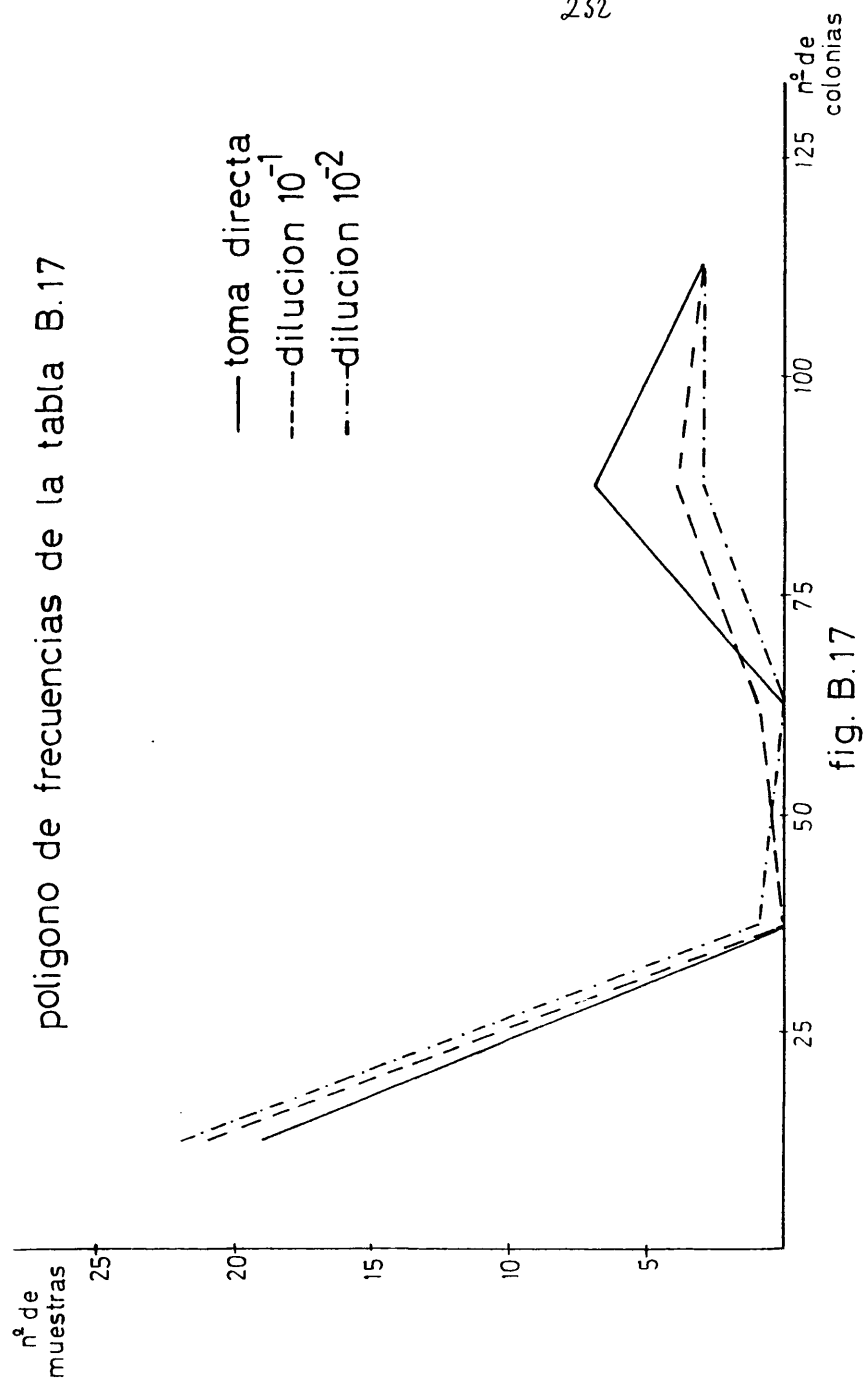
muestras	t d	10^{-1}	10^{-2}
1	6	3	0
2	19	21	34
3	0	0	1
4	0	0	0
5	1	6	8
6	0	2	4
7	100	100	100
8	1	125	3
9	100	100	2
10	100	100	100
11	9	0	17
12	102	3	100
13	0	0	101
14	100	102	109
15	0	0	0
16	0	3	27
17	0	0	0
18	3	0	1
19	0	2	4
20	0	101	0
21	0	100	0
22	0	100	100
23	0	0	100
24	2	6	87
totales	543	874	798

tabla B.16



UFC. totales/cc		platano inicial agar malta	
muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	7	8	0
2	1	3	4
3	1	2	0
4	0	0	0
5	2	2	0
6	7	8	8
7	100	100	50
8	0	12	11
9	0	1	1
10	101	9	125
11	0	106	0
12	0	100	101
13	0	101	0
14	100	0	20
15	100	0	0
16	100	100	100
17	100	1	10
18	100	57	0
19	102	101	1
20	125	0	0
21	3	1	0
22	0	3	100
23	100	100	125
24	0	0	100
25	0	0	1
26	0	0	0
27	0	3	1
28	2	0	5
29	0	0	5
totales	951	818	768

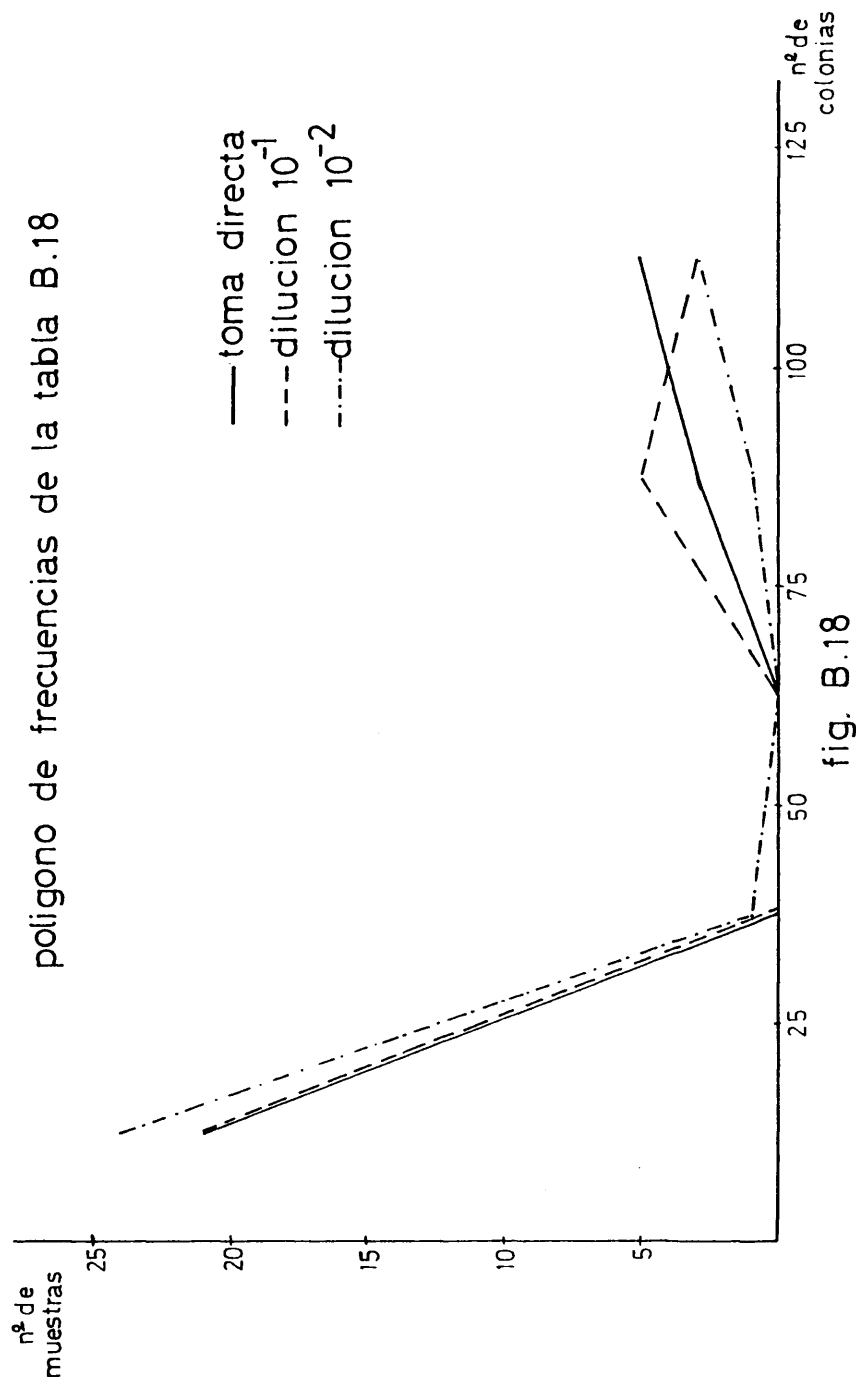
tabla B.17



UFC. totales/cc | platano
inicial
sabouraud

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	0	2	2
2	0	2	4
3	2	1	4
4	1	0	0
5	3	0	2
6	1	3	1
7	100	100	50
8	0	1	1
9	0	0	0
10	100	109	2
11	0	0	0
12	101	0	0
13	0	100	102
14	101	0	8
15	0	102	0
16	0	100	100
17	0	100	0
18	0	0	0
19	0	100	0
20	101	0	125
21	0	11	0
22	109	8	125
23	111	125	0
24	100	18	0
25	5	2	6
26	0	1	0
27	0	0	15
28	0	11	0
29	0	0	4
totales	835	896	547

tabla B.18

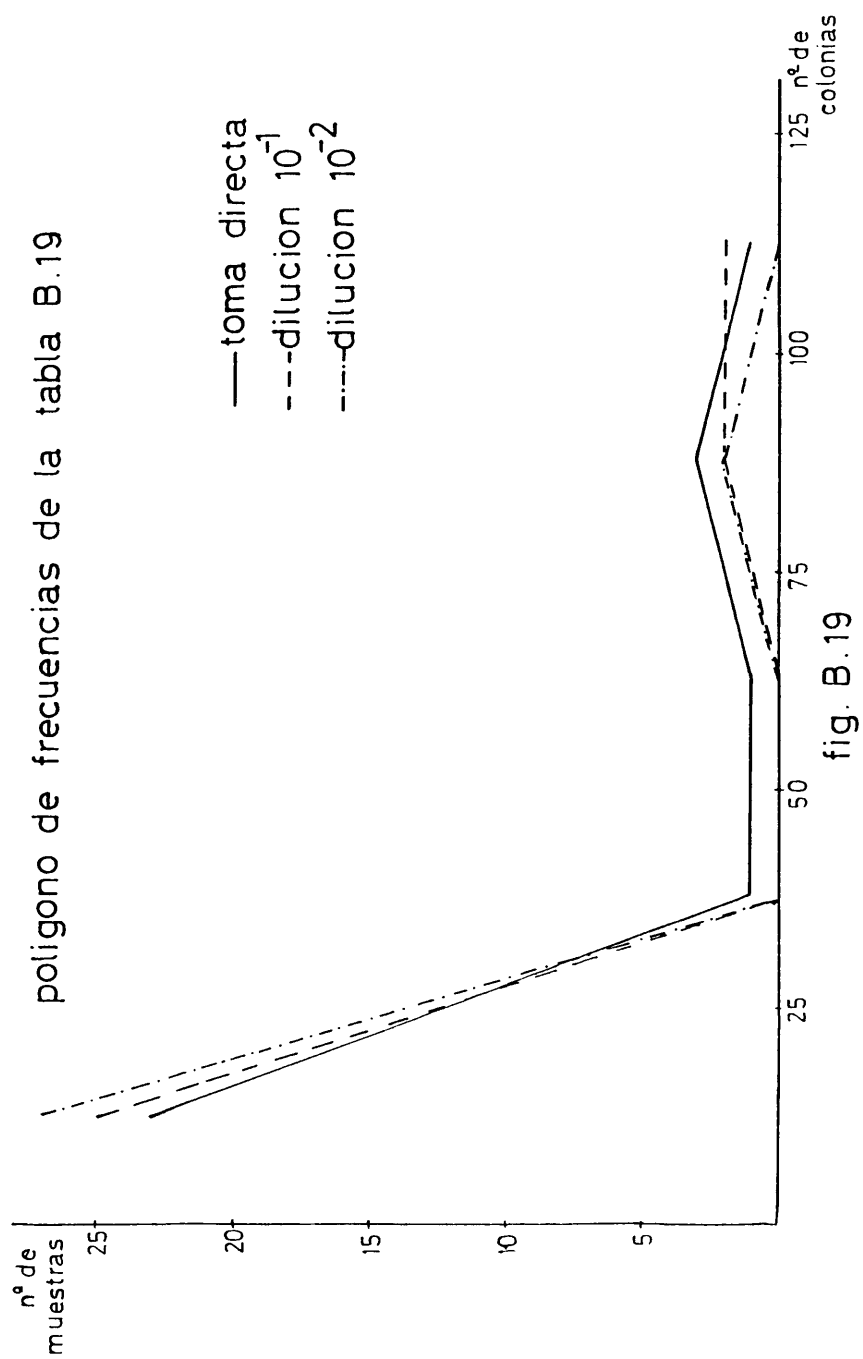


235

UFC. totales/cc | platano
inicial
czapek

muestras	t. d.	10^{-1}	10^{-2}
1	62	8	0
2	0	0	0
3	1	1	20
4	0	0	0
5	0	1	0
6	0	3	0
7	5	25	9
8	0	0	9
9	1	0	1
10	1	125	100
11	0	0	0
12	1	0	100
13	0	1	7
14	100	0	0
15	0	2	3
16	100	100	0
17	0	101	0
18	2	0	0
19	102	0	0
20	100	0	0
21	0	0	0
22	0	0	1
23	0	0	0
24	0	100	1
25	1	3	0
26	0	0	0
27	28	0	0
28	1	0	0
29	4	0	3
totales	510	480	254

tabla B.19

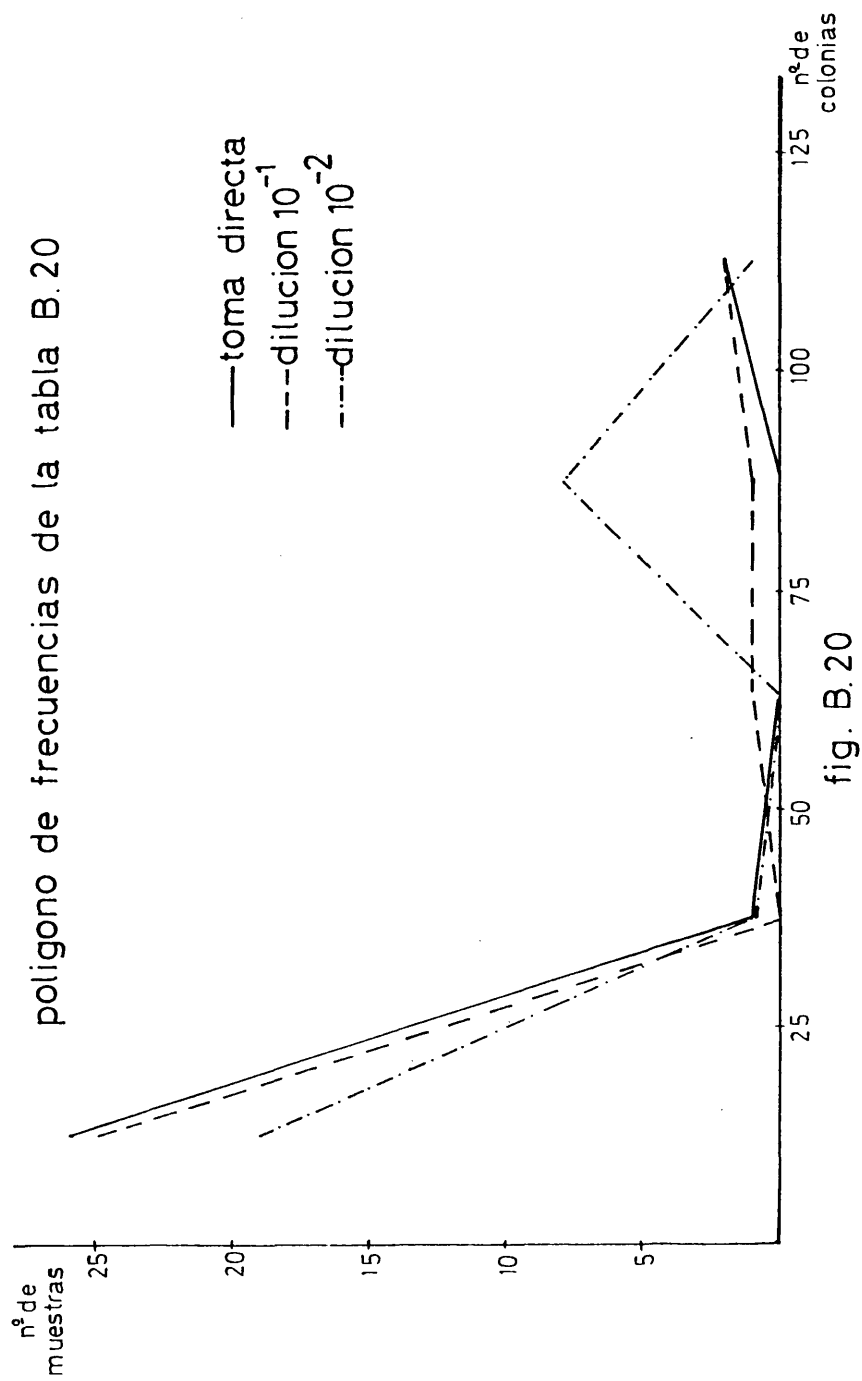


237

UFC. totales/cc | platano
 inicial
 czapek mas E.L.

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	0	7	100
2	0	1	1
3	1	6	1
4	0	0	0
5	0	1	0
6	0	3	4
7	30	0	30
8	0	0	0
9	0	1	0
10	0	0	100
11	0	100	86
12	0	0	100
13	0	101	100
14	0	0	1
15	0	0	0
16	0	0	100
17	1	0	1
18	0	5	1
19	105	2	125
20	0	0	0
21	24	0	100
22	11	102	100
23	1	0	0
24	101	0	2
25	12	0	1
26	0	2	1
27	0	0	15
28	0	0	0
29	0	0	1
totales	286	381	970

tabla B.20

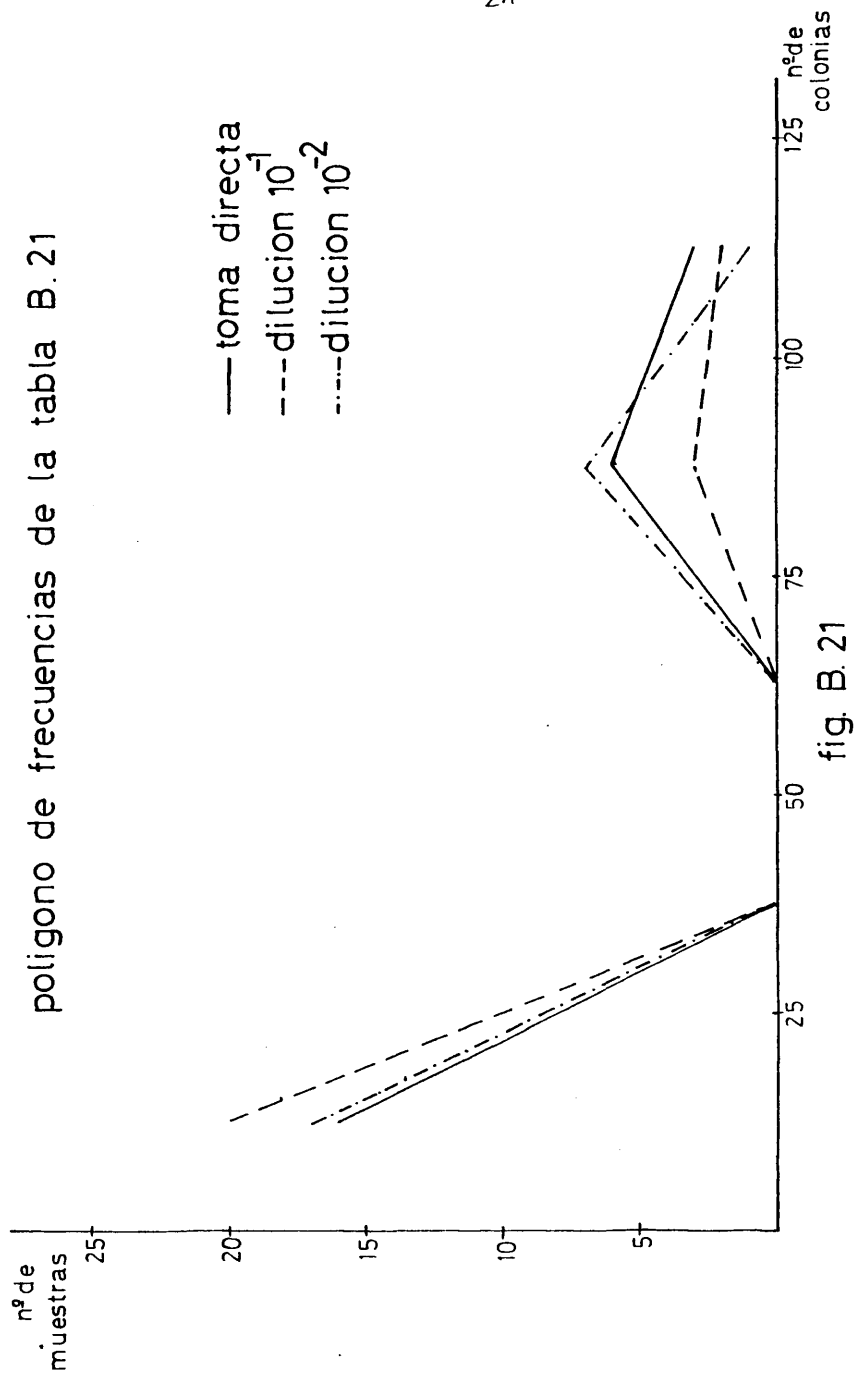


U.F.C. totales /cc

	platano	final	agar malta
--	---------	-------	------------

muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	0	5	0
2	2	5	1
3	0	0	0
4	0	0	2
5	0	0	0
6	0	1	0
7	100	1	100
8	100	2	100
9	100	2	2
10	0	0	2
11	104	0	100
12	1	2	0
13	100	100	100
14	2	0	101
15	0	101	100
16	16	125	2
17	100	8	0
18	0	12	0
19	0	0	1
20	0	0	1
21	0	0	0
22	105	100	100
23	0	0	0
24	100	0	0
25	101	100	100
totales	931	564	813

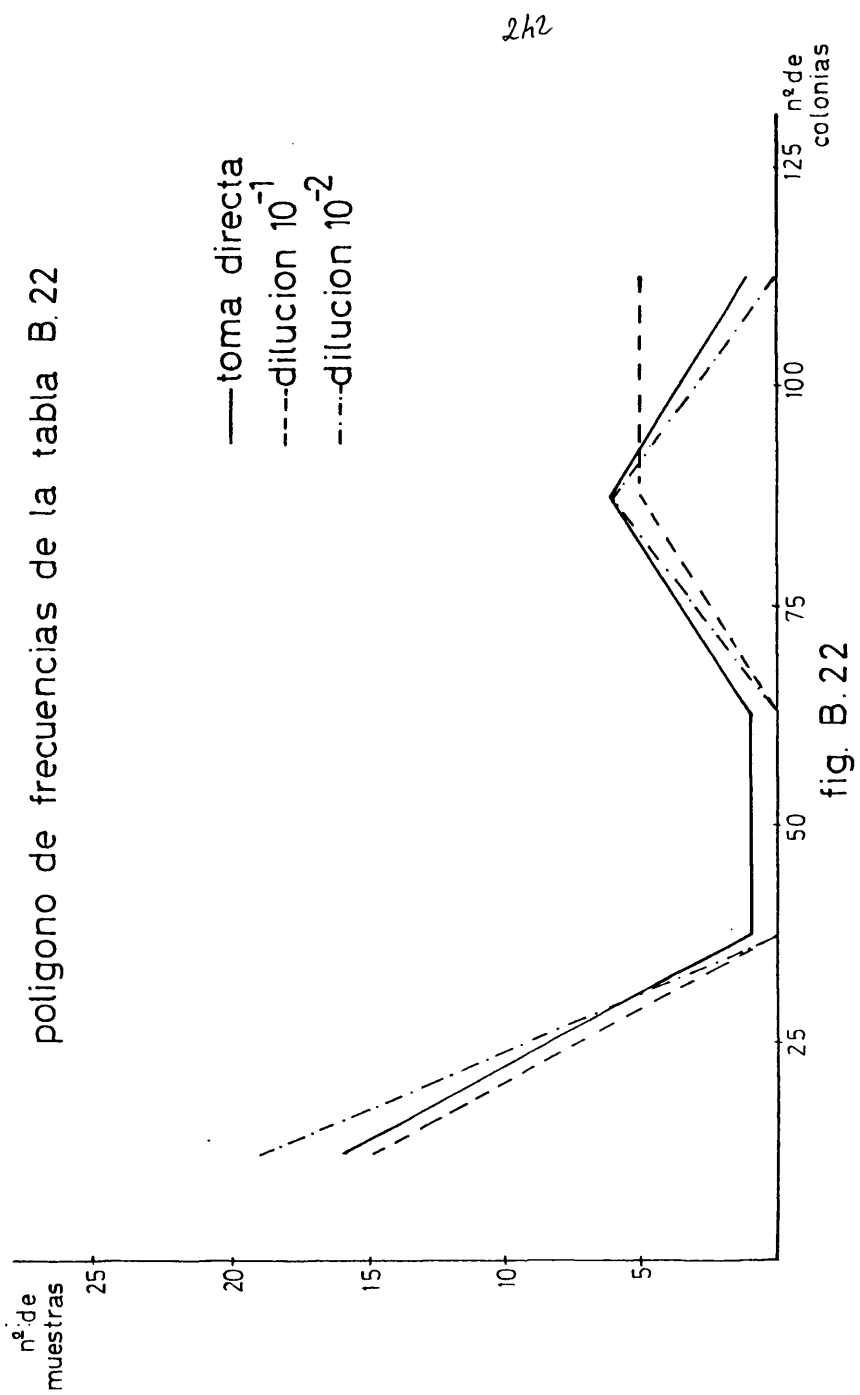
tabla B.21



241

UFC.totales/cc		platano final sabouraud	
muestras	t.d.	10^{-1}	10^{-2}
1	0	1	0
2	2	0	0
3	0	0	0
4	0	1	0
5	2	0	0
6	1	1	23
7	0	100	0
8	100	103	100
9	100	100	1
10	100	0	4
11	101	7	0
12	0	0	0
13	0	100	3
14	1	0	100
15	0	103	1
16	30	125	1
17	100	100	0
18	0	20	100
19	66	1	0
20	1	121	0
21	1	8	0
22	100	101	100
23	100	0	100
24	1	0	100
25	1	100	1
totales	807	1075	634

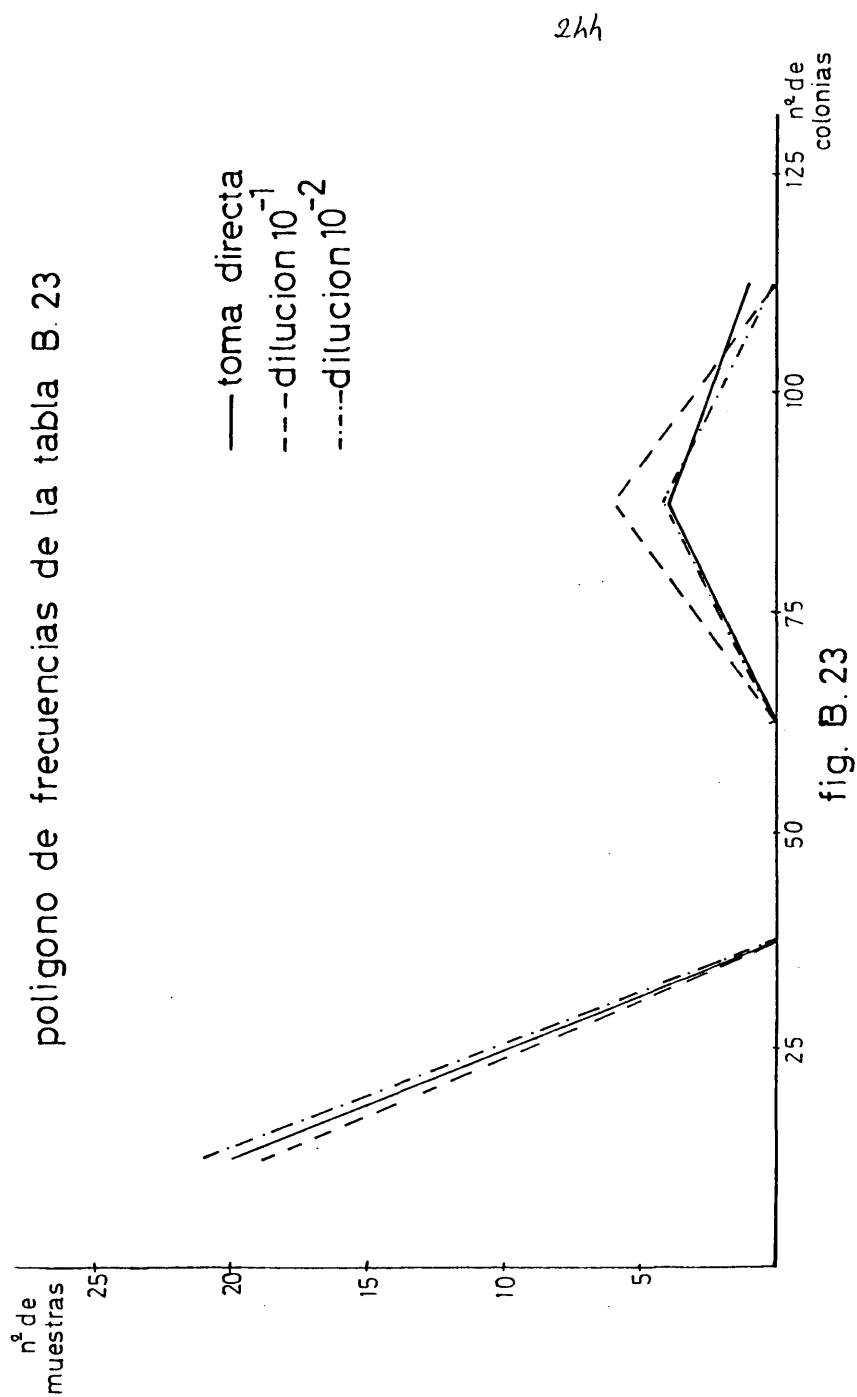
tabla B.22



243

UFC totales/cc		platano final czapek	
muestras	t. d.	10^{-1}	10^{-2}
1	0	1	0
2	0	3	1
3	0	0	0
4	0	0	1
5	0	0	0
6	11	2	0
7	0	0	3
8	100	80	100
9	0	100	0
10	2	2	2
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	100	100
14	100	0	100
15	0	0	0
16	0	100	0
17	100	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	1	0	0
21	0	1	0
22	0	100	0
23	0	100	0
24	101	0	0
25	100	2	100
totales	515	591	417

tabla B.23

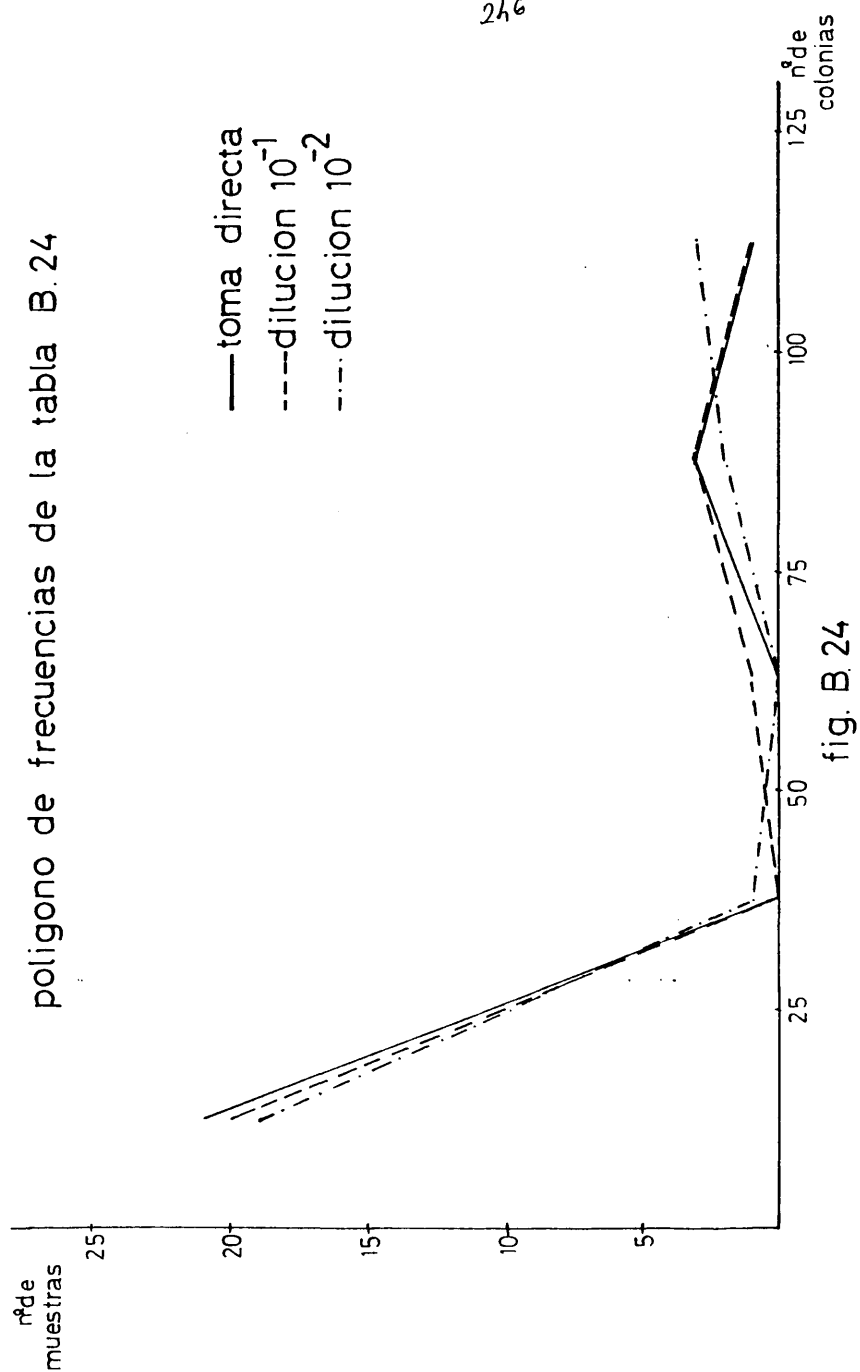


2h⁵

UFC, totales/cc final
 platano
 czapek mas E. L.

muestras	t.d.	10 ⁻¹	10 ⁻²
1	0	8	1
2	1	1	4
3	0	0	0
4	0	0	1
5	0	0	0
6	2	0	1
7	0	2	6
8	0	0	0
9	7	0	103
10	2	0	2
11	1	5	4
12	1	25	101
13	105	100	100
14	1	0	0
15	0	1	1
16	0	73	0
17	0	0	1
18	0	3	34
19	1	0	0
20	1	125	0
21	0	0	2
22	100	100	101
23	100	0	0
24	100	100	100
25	2	0	0
totales	424	513	528

tabla B. 24



V.2.3. Estudio de los medios de cultivo

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el apartado V.2.2., para posteriores estudios, seleccionamos la toma directa.

En este apartado nos proponemos conocer qué medio de cultivo es el mas idóneo para el tipo de alimento, objeto de nuestro estudio.

Para ello se hizo un estudio del número de colonias totales en cada uno de los medios y para cada una de las marcas y sabores.

Estos resultados vienen expresados en las tablas C.1. y C.2 y la representación gráfica de estos valores en las figuras C.1 y C.2.

tabla de totales para iniciales

marcas y sabores		medios		A. M.	Sb.	Cz.	Cz + EL
A	natural			4 4 0	5 2 9	1 5 8	5 5 2
	fresa			6 5 7	7 5 4	4 8 1	6 5 1
	platano			9 5 1	8 3 5	5 1 0	2 8 6
B	natural			9 4 3	3 9 5	6 5 4	8 5 0
	fresa			7 3 1	5 5 1	5 3 2	7 5 8
	platano			1 0 3 8	1 0 8 3	8 1 7	1 1 4 3
C	natural			8 9 4	8 1 5	5 2 6	6 4 9
	fresa			7 3 0	7 1 0	7 1 4	3 3 3
	platano			5 3 3	5 0 8	5 0 6	5 1 3

tabla C.1

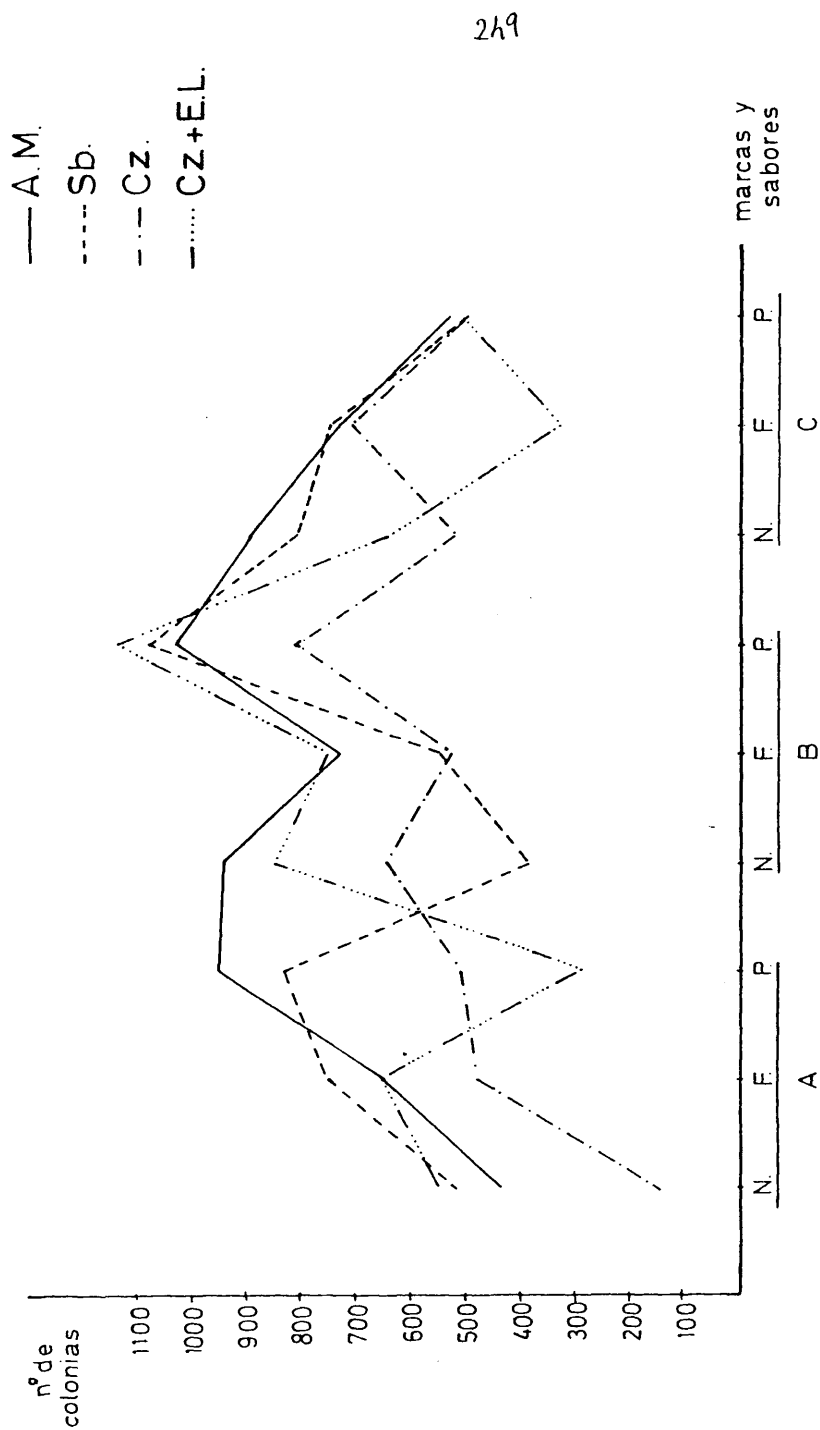


fig. C.1

tabla de totales para finales

marcas y sabores \ medios		A. M.	Sb.	Cz.	Cz+E.L.
A	natural	729	514	511	711
	fresa	682	644	514	543
	platano	931	807	515	424
B	natural	1311	709	1029	1010
	fresa	1024	1271	1070	806
	platano	1322	1429	1139	1007
C	natural	1009	807	806	629
	fresa	712	606	731	00
	platano	623	606	632	604

tabla C.1

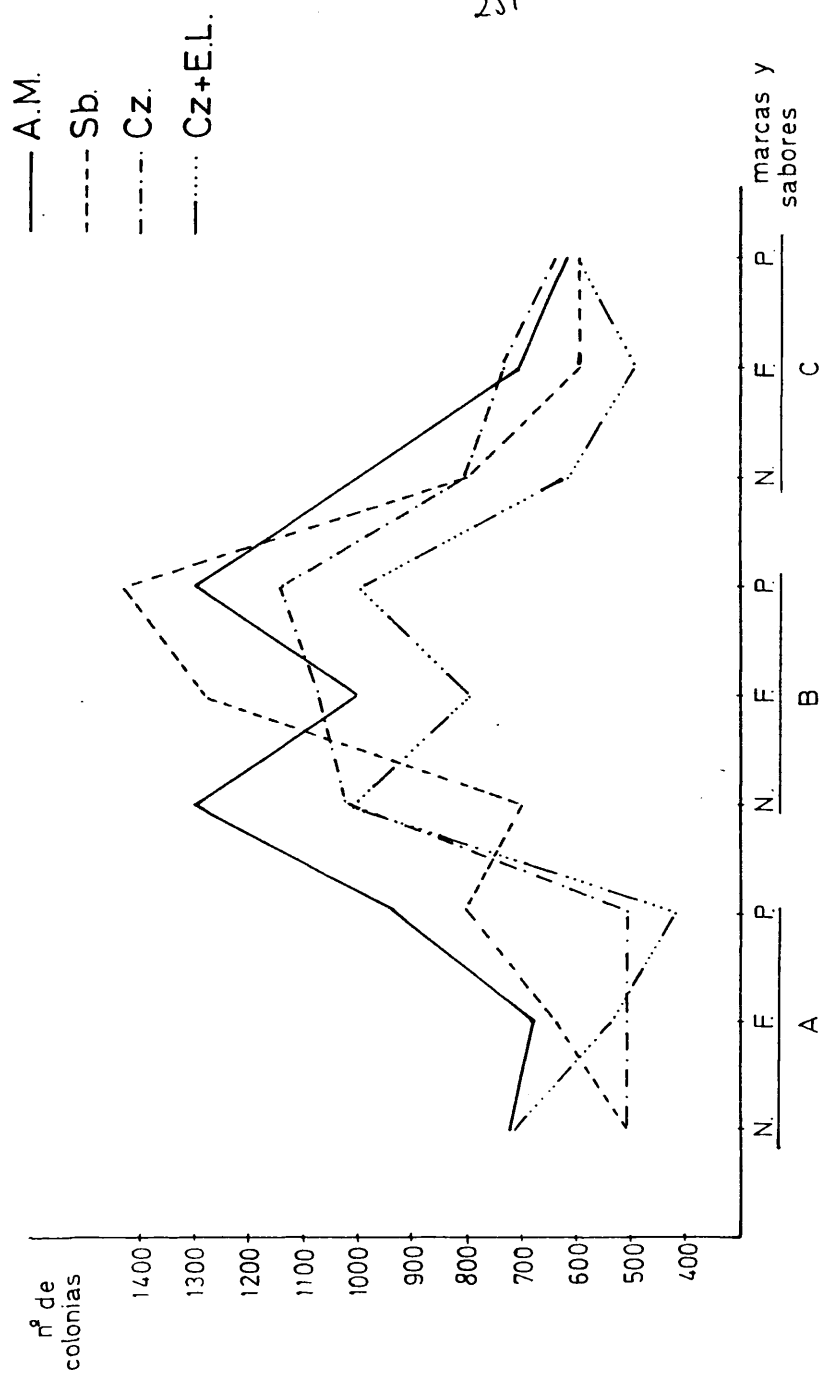


fig. C.2

V.2.4. Estudio de frecuencias de los 4 géneros predominantes dependiendo del medio de cultivo.

Una vez que hemos realizado un estudio general de la idoneidad de los medios de cultivo, vamos a estudiar las diferencias detectadas en la frecuencia de aparición de cada uno de los 4 géneros predominantes dependiendo de la marca y del medio de cultivo utilizado.

Estos resultados vienen expresados en las tablas de la D.1 a la D.8, cuya representación gráfica viene dada en las figuras de la D.1 a la D.8.

frecuencias del genero penicillium, inicial

marcas y sabores medios	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
AGAR MALTA	21,4	21,4	27,5	40,7	42,8	35,7	34,6	20,6	19,2
SABOURAUD	25	10,7	17,2	40,7	21,4	21,4	26,9	27,5	7,6
CZAPEK	14,2	14,2	27,5	14,8	25	25	23	10,3	11,5
CZAPEK + E.L.	35	10,7	20,6	22,2	14,2	25	23	20,6	19,2

tabla D.1

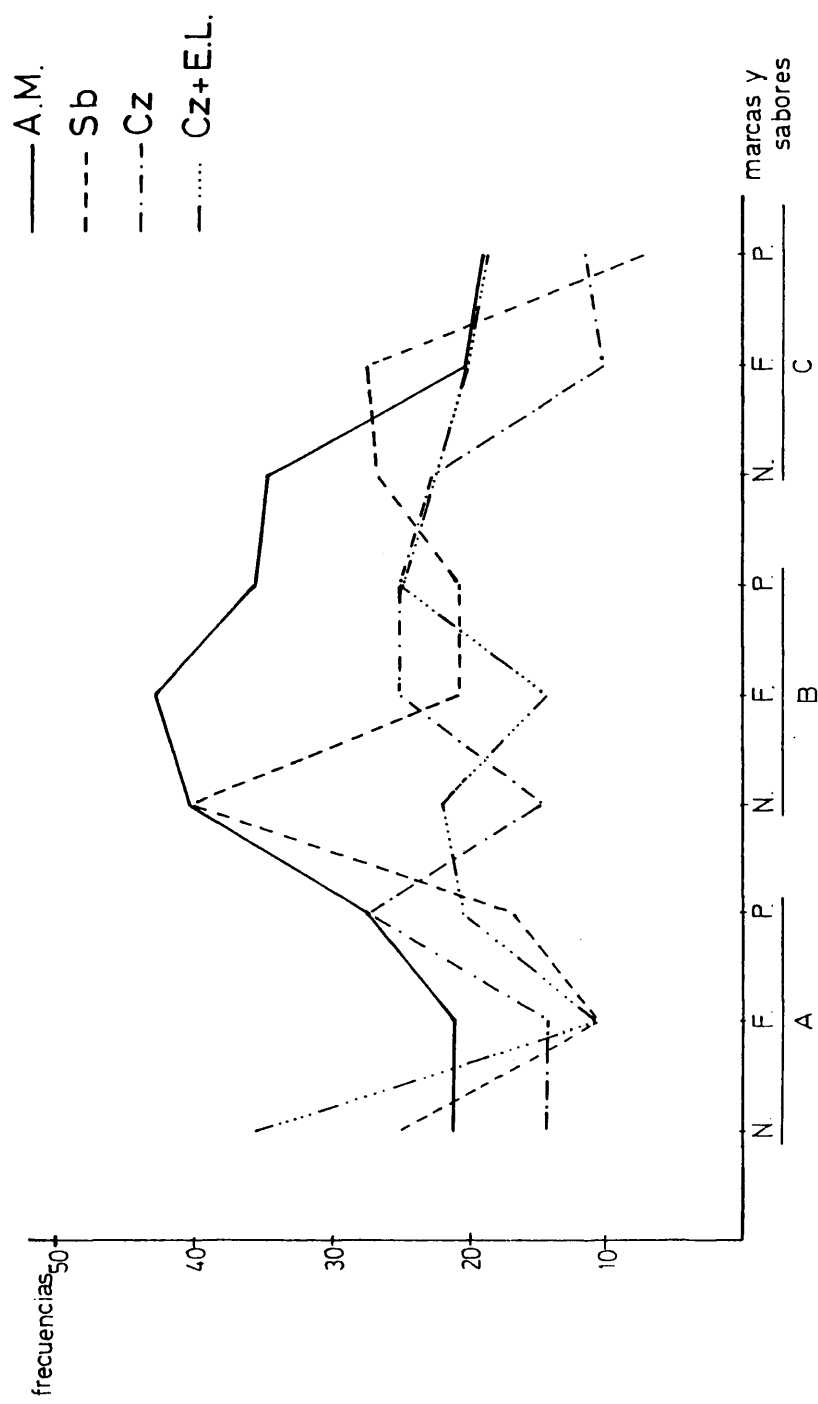


fig. D.1

frecuencias del. genero penicillium, final

marcas y sabores medios	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
AGAR MALTA	24	20,8	24	12,5	40	20,8	16,6	18,5	15,3
SABOURAUD	28	25	32	4,1	28	8,3	20,8	11,1	15,3
CZAPEK	16	16,6	4	8,3	24	20,8	20,8	7,4	11,5
CZAPEK+E.L.	12	20,8	16	20,8	36	8,3	12,5	0	3,8

tabla D.2

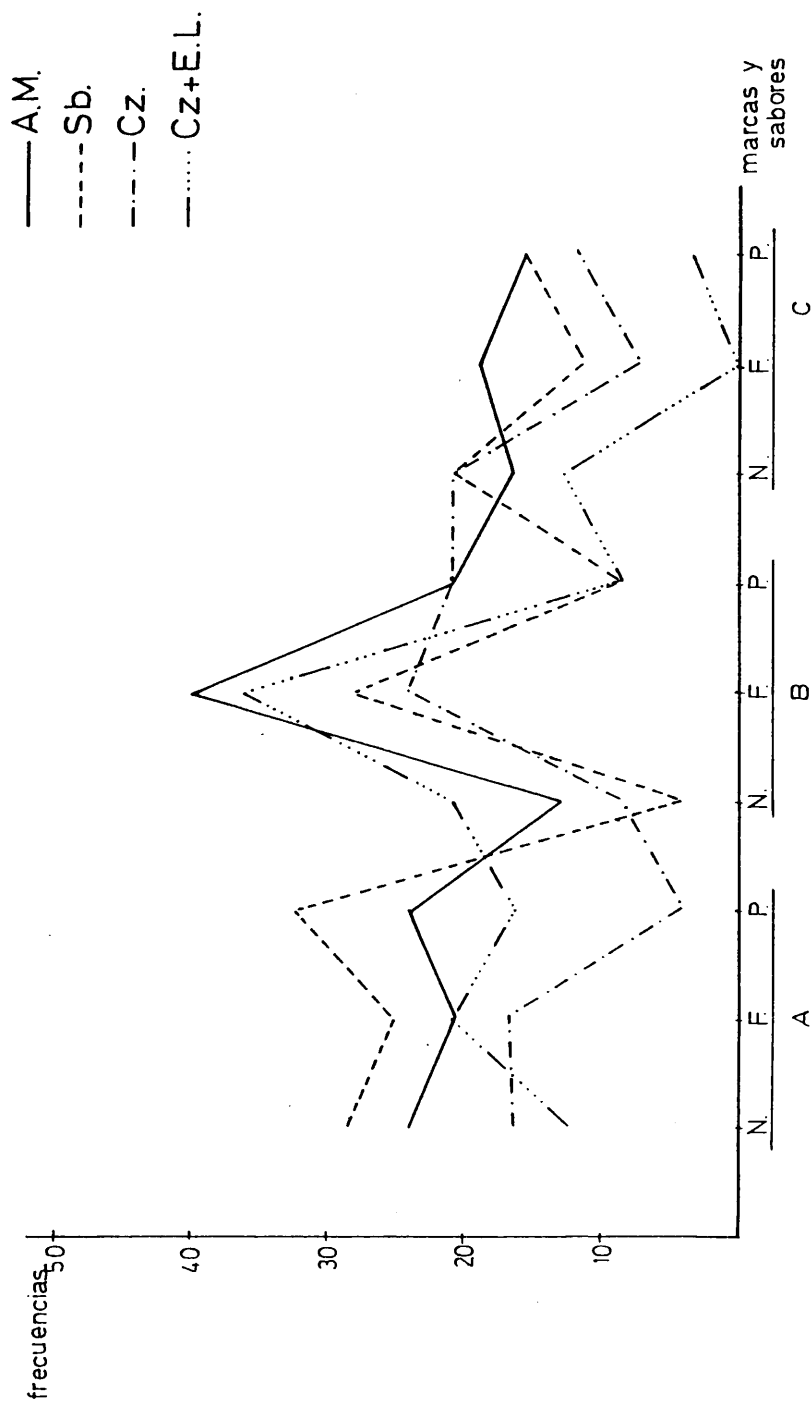


fig. D.2

frecuencias del genero cladosporium, inicial

marcas y sabores medios	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
AGAR MALTA	7,1	10,7	0	3,7	7,1	10,7	0	6,8	0
SABOURAUD	0	0	3,4	11,1	3,5	3,5	3,8	0	0
CZAPEK	3,5	0	0	3,7	3,5	3,5	3,8	0	0
CZAPEK+E.L.	14,2	10,7	6,8	3,7	3,5	0	3,8	13,7	3,8

tabla D.3

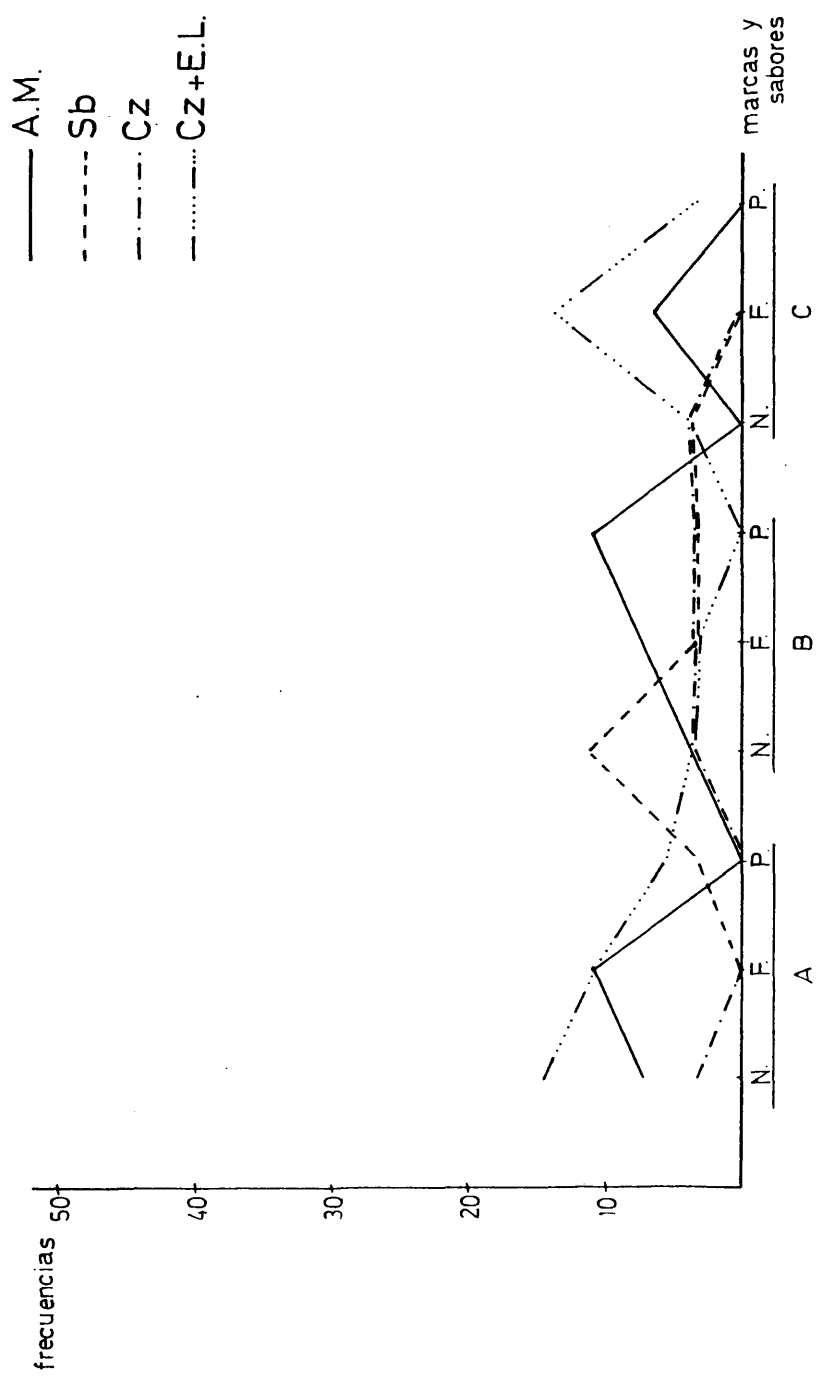


tabla D.3

frecuencias del genero cladosporium , final

259

marcas y sabores medios	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
AGAR MALTA	16	0	4	8,3	8	4,1	4,1	0	0
SABOURAUD	8	0	4	8,3	4	0	4,1	0	0
CZAPEK	0	8,3	8	4,1	0	0	0	3,7	0
CZAPEK+E.L.	0	8,3	4	12,5	4	4,1	4,1	0	0

tabla D.4

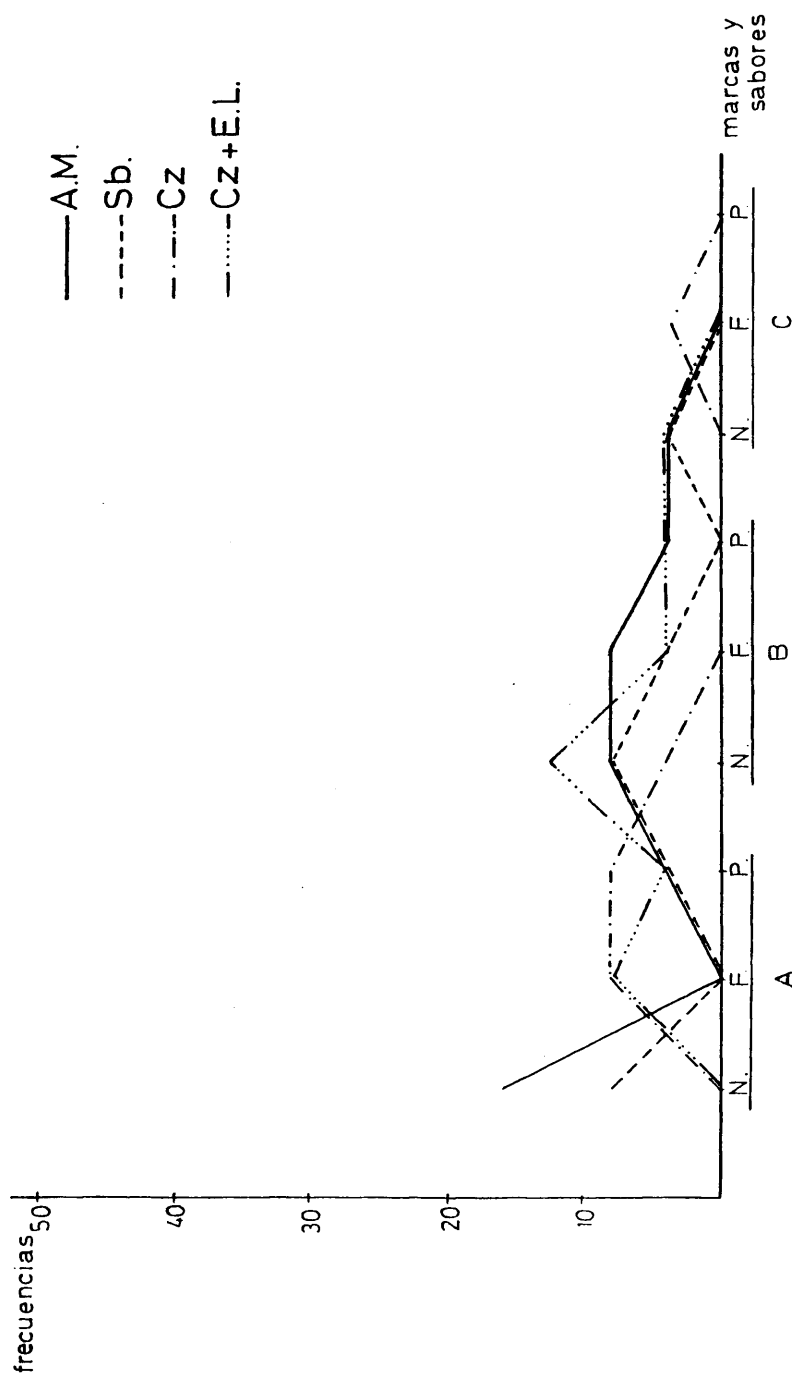


fig. D.4

frecuencias del genero monilia, inicial

marcas y sabores medios	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
AGAR MALTA	14,2	21,4	21,1	33,3	21,4	35,7	23	20,6	19,2
SABOURAUD	14,2	25	24,1	11,1	17,8	32,1	23	24,1	15,3
CZAPEK	0	14,2	17,2	22,2	14,2	21,4	15,3	24,1	19,2
CZAPEK+E.L	14,2	21,4	6,8	29,6	25	35,7	26,9	10,3	15,3

tabla D.5

— A M
 --- Sb
 - - - - Cz
 Cz+E.L.

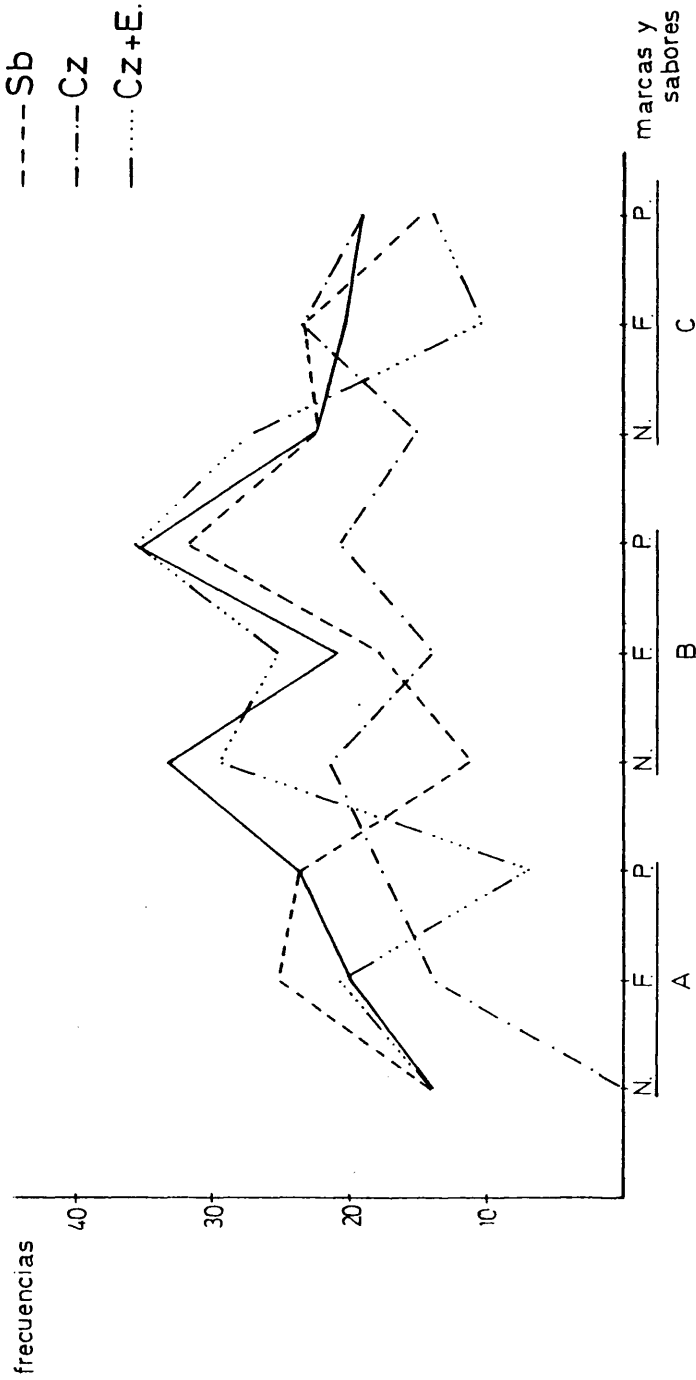


fig. D. 5

frecuencias del genero monilia_final

263

marcas y sabores medios	A			B			C		
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.
AGAR MALTA	28	25	40	50	36	50	45,8	25,9	23,0
SABOURAUD	20	20,8	36	29,1	40	58,3	33,3	25,7	23
CZAPEK	20	12,5	20	41,6	32	45,8	33,3	25,9	23
CZAPEK+EL	24	20,8	24	33,3	28	37,5	25	18,5	23

tabla D.6

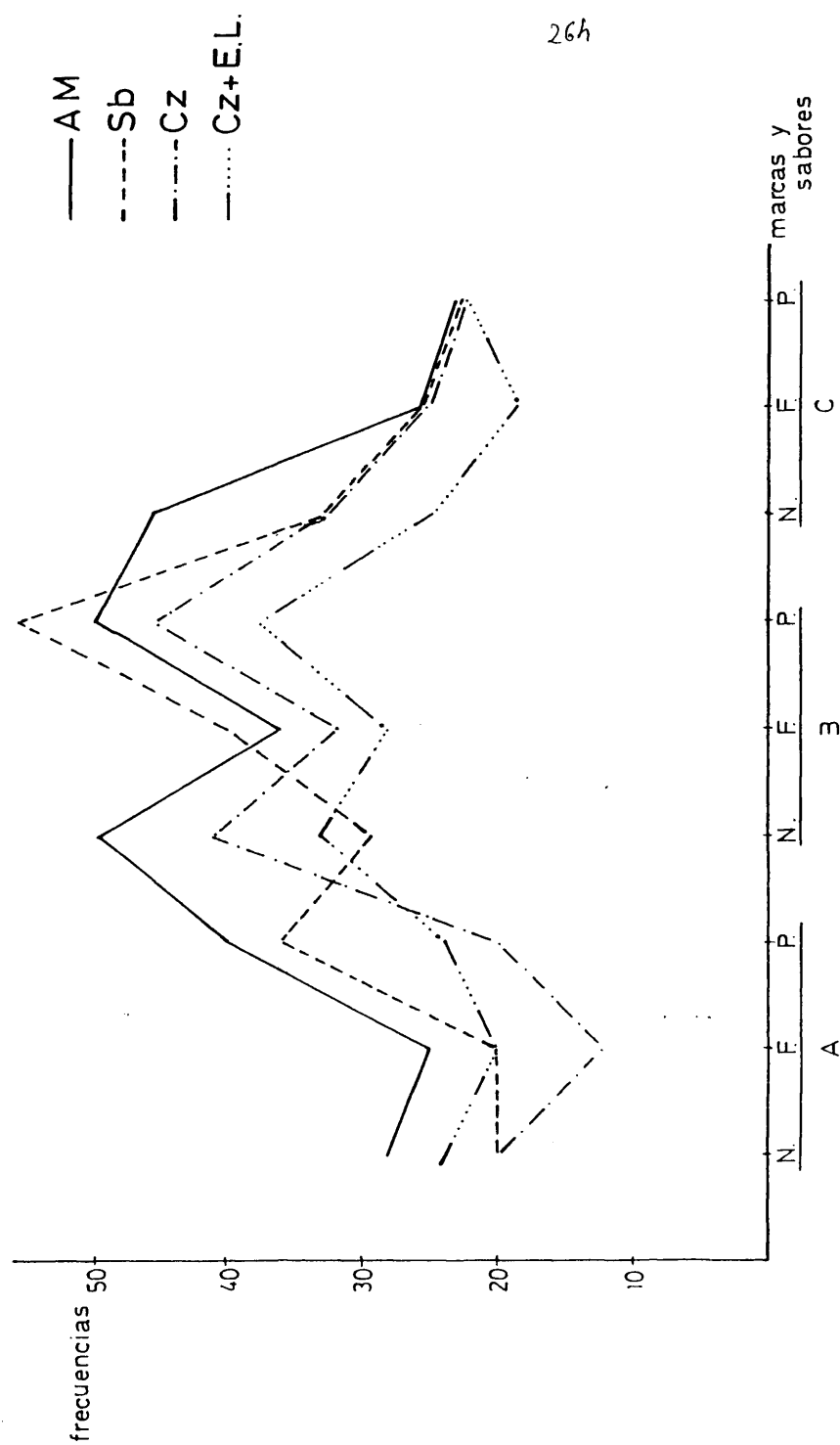


fig. D.6

frecuencias de aparición de levaduras, inicial

marcas y sabores medios	A			B			C	
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa plat.
AGAR MALTA	3,5	17,8	13,7	3,7	3,5	3,5	15,3	6,8 7,6
SABOURAUD	7,1	17,8	17,2	3,7	3,5	10,7	23	3,4 3,8
CZAPEK	10,7	17,8	6,8	3,7	3,5	0	7,6	0
CZAPEK+EL.	10,7	10,7	10,3	14,8	7,1	7,1	3,8	6,8 3,8

tabla D.7



— A.M.
 --- Sb.
 -.-.- Cz.
 Cz.+E.L.

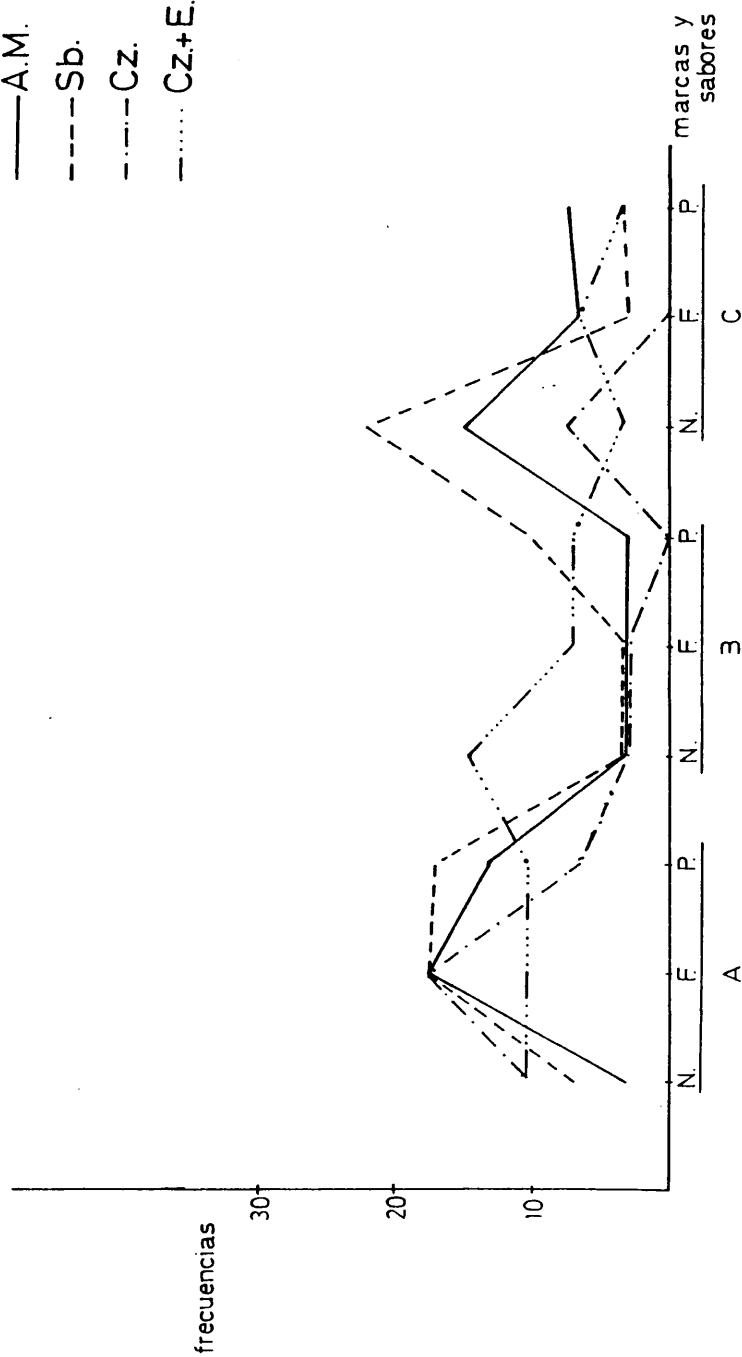


fig. D.7

frecuencias de aparicion de levaduras, final

marcas y sabores medios	A			B			C	
	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa	plat.	nat.	fresa plat.
AGAR MALTA	8	20, 8	8	4, 1	8	8, 3	0	3, 8
SABOURAUD	0	12, 5	8	0	28	4, 1	0	3, 8
CZAPEK	0	12, 5	0	4, 1	8	0	0	0
CZAPEK+E.L.	8	12, 5	12	0	8	4 1	4, 1	3, 8

tabla D.8

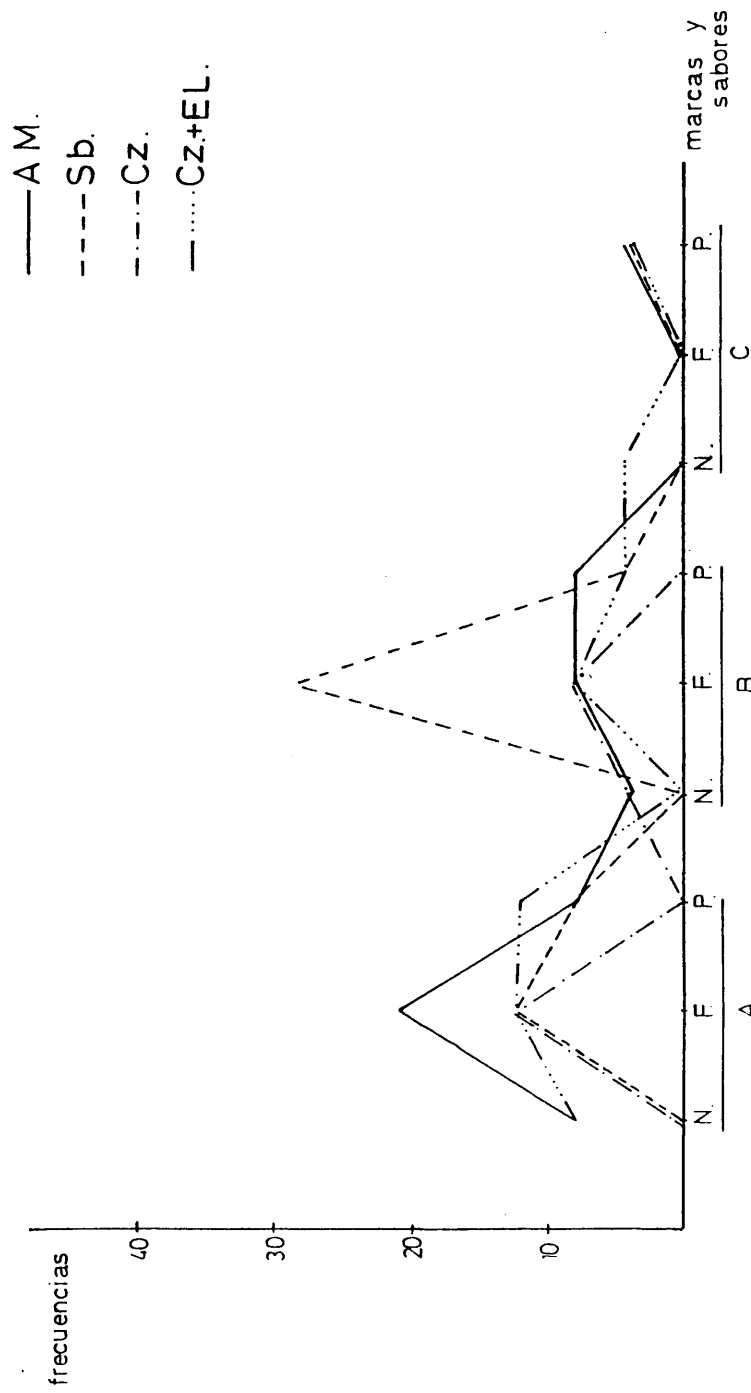


fig. D.8

V.2.5. Prueba del χ^2

El cálculo del valor del χ^2 para las distintas tablas de - contingencia según la fórmula simplificada expresada en el apartado IV.3.6.1. se ha realizado mediante un ordenador HP-250, ejecutando un programa descrito para la realización de este cálculo en lenguaje BASIC.

Aplicando el programa obtenemos los resultados del χ^2 , que nos relaciona los distintos géneros aislados para cada marca y sabor dependiendo de las situaciones inicial y final.

Los géneros estudiados han sido: *Penicillium*, *Alternaria Cladosporium*, *Aspergillus*, *Micelia sterilia*, *Monilia*, *Rhizopus* y levaduras.

Los resultados obtenidos nos permiten apreciar diferencias - significativas en los siguientes casos:

MARCA A

— SABOR NATURAL

- . *Penicillium*, medio de cultivo Czapek mas extracto de levadura.
- . *Cladosporium*, medio de cultivo Czapek mas extracto de levadura.
- . *Micelia sterilia*, medio de cultivo Sabouraud.
- . *Monilia*, medio de cultivo Czapek-

— SABOR PLATANO

- . *Penicillium*, medio de cultivo: Czapek.

MARCA B

— SABOR NATURAL

- . *Penicillium*, medio de cultivo: Agar Malta.
- . *Penicillium*, medio de cultivo: Sabouraud.
- . Levaduras, medio de cultivo: Czapeck mas extracto de levadura.

— SABOR FRESA

- Levaduras, medio de cultivo: Sabouraud.

MARCA C

— SABOR NATURAL

- . Levaduras, medio de cultivo: Agar Malta
- . Levaduras, medio de cultivo: Sabouraud.

— SABOR FRESA

- . *Penicillium* medio de cultivo: Czapeck mas extracto de levadura.
- . *Cladosporium*, medio de cultivo: Czapeck mas extracto de levadura.

```

10 OPTION BASE 1
20 DIM Z$(30)
30 REAL Conta
40 PRINTER IS 1
50 I=0
60 Leer:READ A,B,C,D
70 I
80 IF A+B=0 THEN
90 GOSUB Cabe
100 PRINT USING "35X,2D,4X,2D",A,B
110 PRINT USING "35X,2D,4X,2D,21X,30A",C,D,"PRIMERA FILA SUMA CERO"
120 PRINT
130 GOTO Leer
140 END IF
150 IF C+D=0 THEN
160 GOSUB Cabe
170 PRINT USING "35X,2D,4X,2D",A,B
180 PRINT USING "35X,2D,4X,2D,21X,30A",C,D,"SEGUNDA FILA SUMA CERO"
190 GOTO Leer
200 END IF
210 IF A+C=0 THEN
220 GOSUB Cabe
230 PRINT USING "35X,2D,4X,2D",A,B
240 PRINT USING "35X,2D,4X,2D,21X,30A",C,D,"PRIMERA COLUMNA SUMA CERO"
250 PRINT
260 GOTO Leer
270 END IF
280 IF B+D=0 THEN
290 GOSUB Cabe
300 PRINT USING "35X,2D,4X,2D",A,B
310 PRINT USING "35X,2D,4X,2D,21X,30A",C,D,"SEGUNDA COLUMNA SUMA CERO"
320 PRINT
330 I=I+1
340 GOTO Leer
350 END IF
360 N=A+B+C+D
370 E=ABS(A*D-B*C)
380 X=N+E*E/((A+B)*(C+D)*(A+C)*(B+D))
390 GOSUB Cabe
400 PRINT USING FormatA,B
410 PRINT USING FormatA,B
420 PRINT
430 GOTO Leer
431 I
432 I
433 I
434 I
435 I
436 I
437 I

```



```

439 |
440 |
441 |
442 |
443 |
444 |
445 |
446 |
448 Form:IMAGE 35X,2D,4X,2D,21X,2ZR3D
450 Cabell
460 IF I MOD 32=0 THEN
470   Conto=I/32
480   SELECT Conto
490   CASE 0
500     Z$=" MARCA A ISABOR NATURAL"
510   CASE 1
520     Z$=" MARCA A ISABOR FRESA "
530   CASE 2
540     Z$=" MARCA A ISABOR PLATANO"
550   CASE 3
560     Z$=" MARCA B ISABOR NATURAL"
570   CASE 4
580     Z$=" MARCA B ISABOR FRESA "
590   CASE 5
600     Z$=" MARCA B ISABOR PLATANO"
610   CASE 6
620     Z$=" MARCA C ISABOR NATURAL"
630   CASE 7
640     Z$=" MARCA C ISABOR FRESA "
650   CASE 8
660     Z$=" MARCA C ISABOR PLATANO"
670   END SELECT
680   IF I<>0 THEN PRINT LIN(15)
690   PRINT LIN(6)
700   PRINT CHR$(27)&"&k15";SPA(16);Z$
710   PRINT SPA(16);RPT$(" ",22)
720   PRINT CHR$(27)&"&k08"
730   END IF
740   IF I MOD 16=0 THEN
750     IF (I<>0) AND (I MOD 32<>0) THEN
760       PRINT LIN(15)
770     ELSE
780       PRINT LIN(2)
790     END IF
800     PRINT SPA(35);" TABLA
810     PRINT SPA(35)}"=====
820   END IF
830   I=I+1
840   RETURN
841 |
842 |
843 |
844 |
845 |
846 |
847 |
848 |
849 |
850 |

```

CHI-CUADRADO"
=====

[illegible]

1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500	1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568	1569	1570	1571	1572	1573	1574	1575	1576	1577	1578	1579	1580	1581	1582	1583	1584	1585	1586	1587	1588	1589	1590	1591	1592	1593	1594	1595	1596	1597	1598	1599	1600	1601	1602	1603	1604	1605	1606	1607	1608	1609	1610	1611	1612	1613	1614	1615	1616	1617	1618	1619	1620	1621	1622	1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630	1631	1632	1633	1634	1635	1636	1637	1638	1639	1640	1641	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648	1649	1650	1651	1652	1653	1654	1655	1656	1657	1658	1659	1660	1661	1662	1663	1664	1665	1666	1667	1668	1669	1670	1671	1672	1673	1674	1675	1676	1677	1678	1679	1680	1681	1682	1683	1684	1685	1686	1687	1688	1689	1690	1691	1692	1693	1694	1695	1696	1697	1698	1699	1700	1701	1702	1703	1704	1705	1706	1707	1708	1709	1710	1711	1712	1713	1714	1715	1716	1717	1718	1719	1720	1721	1722	1723	1724	1725	1726	1727	1728	1729	1730	1731	1732	1733	1734	1735	1736	1737	1738	1739	1740	1741	1742	1743	1744	1745	1746	1747	1748	1749	1750</
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	--------

TABLA

CHI-CUADRADO

6	22		
6	19	00,050	
7	21		
7	18	00,061	
4	24		
4	21	00,030	
10	18		
3	22	<u>04,012</u>	
1	27		
0	25	00,910	
0	28		
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	28		
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	28		
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
2	26		
4	21	01,032	
0	28		
2	23	02,328	
1	27		
0	25	00,910	
4	24		
0	25	<u>03,863</u>	
0	28		
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	28		
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
1	27		
0	25	00,910	
1	27		
0	25	00,910	

CHI-CUADRADO

TABLA

1	27	
0	25	00,910
4	24	
0	25	<u>03,863</u>
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
1	27	
0	25	00,910
4	24	
7	18	01,510
4	24	
5	20	00,306
0	28	
5	20	<u>06,183</u>
4	24	
6	19	00,814
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
1	27	
2	23	00,485
2	26	
0	25	01,856
3	25	
0	25	02,839
3	25	
2	23	00,114

CHI-CUADRADO

TABLA

6	22	
5	19	00,003
3	25	
6	18	01,843
4	24	
4	20	00,056
3	25	
5	19	01,017
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
3	25	
0	24	02,729
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
2	22	02,427
3	25	
2	22	00,084
0	28	
1	23	01,190
1	27	
1	23	00,012
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

TABLA		CHI-CUADRADO	
=====		=====	
0	28		
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
1	27		
1	23	00,012	
1	27		
0	24	00,874	
0	28		
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
6	22		
6	18	00,093	
7	21		
5	19	00,126	
4	24		
3	21	00,035	
6	22		
4	20	00,189	
0	28		
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	28		
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	28		
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	28		
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
5	23		
5	19	00,074	
5	23		
3	21	00,285	
5	23		
3	21	00,285	
3	25		
3	21	00,040	

CHI-CUADRADO

TABLA

8	21	
6	19	
5	24	
8	17	
8	21	
1	24	
6	23	
4	21	
0	29	
0	25	
0	29	
0	25	
0	29	
1	24	
0	29	
1	24	
1	28	
0	25	
0	29	
2	23	
2	27	
1	24	
1	28	
0	25	
0	29	
0	25	
1	28	
1	24	
0	29	
0	25	

00,090

01,600

05,378

00,196

PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

01,182

01,182

00,878

02,409

00,215

00,878

PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

00,011

PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

CHI-CUADRADO
=====

TABLA
=====

1	28	
0	25	00,878
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	25	
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	25	
0	29	01,182
1	24	
7	22	01,566
10	15	
7	22	00,906
9	16	
5	24	00,068
5	20	
2	27	03,112
6	19	
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	25	
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	25	
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	25	
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
4	25	00,456
2	23	
5	24	01,016
2	23	
2	27	01,790
0	25	
3	26	00,037
3	22	

CHI-CUADRADO

TABLA

11	16	
3	21	05,088
11	16	
1	23	09,446
4	23	
2	22	00,514
6	21	
5	19	00,014
0	27	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	27	
2	22	02,342
0	27	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	27	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
1	26	
2	22	00,492
3	24	
2	22	00,111
1	26	
1	23	00,007
1	26	
3	21	01,360
0	27	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	27	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	27	
1	23	01,148
0	27	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

TABLE A

282

283

TABLA		CHI-CUADRADO
12	16	
10	15	00,044
6	22	
7	18	00,308
7	21	
6	19	00,007
4	24	
9	16	03,364
1	27	
0	25	00,910
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
2	26	
2	23	00,014
1	27	
1	24	00,807
1	27	
0	25	00,910
1	27	
1	24	00,007
0	28	
3	22	03,562
0	28	
1	24	01,142
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
1	24	01,142

CHI-CUADRADO

TABLA

1	27	
0	25	00,910
1	27	
0	25	00,910
0	28	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	25	
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
6	22	
9	16	01,382
5	23	
10	15	03,191
4	24	
8	17	02,366
7	21	
7	18	00,061
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	25	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
1	27	
2	23	00,485
1	27	
7	21	<u>05,250</u>
1	27	
2	23	00,485
2	26	
2	23	00,014

TABLA

CHI-CUADRADO

10	18	
5	19	01,394
6	22	
2	22	01,702
7	21	
5	19	00,126
2	21	
2	22	02,508
1	27	
0	24	00,874
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
3	25	
1	23	00,780
1	27	
0	24	00,874
1	27	
0	24	00,874
0	28	
1	23	01,190
0	28	
1	23	01,190
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

TABLA		CHI-CUADRADO	
1	17		
0	24	01,366	
3	25		
0	24	02,739	
0	28		
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
1	27	00,874	
0	24		
10	18	01,081	
12	12		
9	19	03,594	
14	10		
6	22	03,498	
11	13		
10	18	00,018	
9	15		
0	28	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	24		
0	28	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	24		
0	28	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	24		
1	27	00,539	
2	22		
3	25	00,780	
1	23		
0	28	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	24		
2	26	00,211	
1	23		

CHI-CUADRADO

TABLA

9	17	
4	20	02,090
7	19	
5	19	00,254
6	20	
5	19	00,037
6	20	
3	21	00,946
0	26	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
1	23	01,105
1	25	
1	23	00,003
1	25	
0	24	00,942
1	25	
1	24	00,001
0	26	
1	23	01,105
0	26	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	24	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO

CHI-CUADRADO

TABLA

0 26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	02,880
0 24		
0 26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	00,651
0 24		
0 26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	02,204
0 24		
0 26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	00,024
0 24		
6 20		00,942
11 13		
6 20		
8 16		
4 22		
8 16		
7 19		
6 18		
1 25		
0 24		
0 26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0 24		
0 26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0 24		
0 26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0 24		
4 22		04,013
0 24		
6 20		06,294
0 24		
2 24		01,923
0 24		
1 25		00,003
1 23		

TABLA		CHI-CUADRADO	
6	23		
5	22	00,042	
8	21		
3	24	02,404	
3	26		
2	25	00,148	
6	23	<u>06,257</u>	
0	27		
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	27		
0	29		
1	26	01,094	
0	29		
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	29		
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
2	27		
0	27	01,931	
0	29		
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	29		
1	26	01,094	
4	25		
0	27	<u>04,011</u>	
0	29		
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	29		
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	29		
1	26	01,094	
0	29		
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	

CHI-CUADRADO

TABLA

0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	27	
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	27	
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	27	
0	29	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	27	
6	23	
7	20	00,215
7	22	
7	20	00,024
7	22	
7	20	00,024
3	26	
5	22	00,763
0	29	
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	28	
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	29	
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	29	
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
2	27	
0	27	01,931
1	28	
0	27	00,948
0	29	
0	27	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
2	27	
0	27	01,931

TABLA

CHI-CUADRADO

5	21	
4	22	00,134
2	24	
4	22	00,754
3	23	
3	23	00,000
5	21	
1	25	03,014
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
1	25	
0	26	01,020
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO
0	26	

TABLA		CHI-CUADRADO	
-----		-----	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
5	21		
6	20	00,115	
4	22		
6	20	00,495	
5	21		
6	20	00,115	
4	22		
6	20	00,495	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
2	24		
0	26	02,080	
1	25		
1	25	00,000	
0	26		
0	26	PRIMERA COLUMNA SUMA CERO	
1	25		
1	25	00,000	

V.2.6. Estudio de los componentes principales

Este método hace visible la distribución espacial de los distintos géneros, refiriendo su situación a dos o tres ejes cartesianos.

Partiendo de un cuadro de doble entrada, géneros por variables, el programa caracteriza a los géneros mediante una serie de nuevas variables incorreladas (factores) y da las correlaciones de estas variables con las variables iniciales.

Este programa permite obtener también la representación gráfica simultánea de variables y géneros en los planos constituidos por los dos primeros factores y por el primer factor y el tercero.

Hemos realizado este estudio para el caso de los yogures recién elaborados y los analizados el día de su fecha de caducidad, por separado.

En la representación gráfica del primer caso podemos observar cómo se nos forman 4 grupos bien delimitados, 2 en la parte superior del plano que corresponden a los géneros aislados con una mayor frecuencia y 2 en la parte inferior correspondiendo a géneros cuya frecuencia es menor, pero que todavía pueden ser representados gráficamente, puesto que existen otros que aparecen en la línea inferior y de los cuales no se puede obtener ninguna representación por tener una frecuencia muy pequeña.

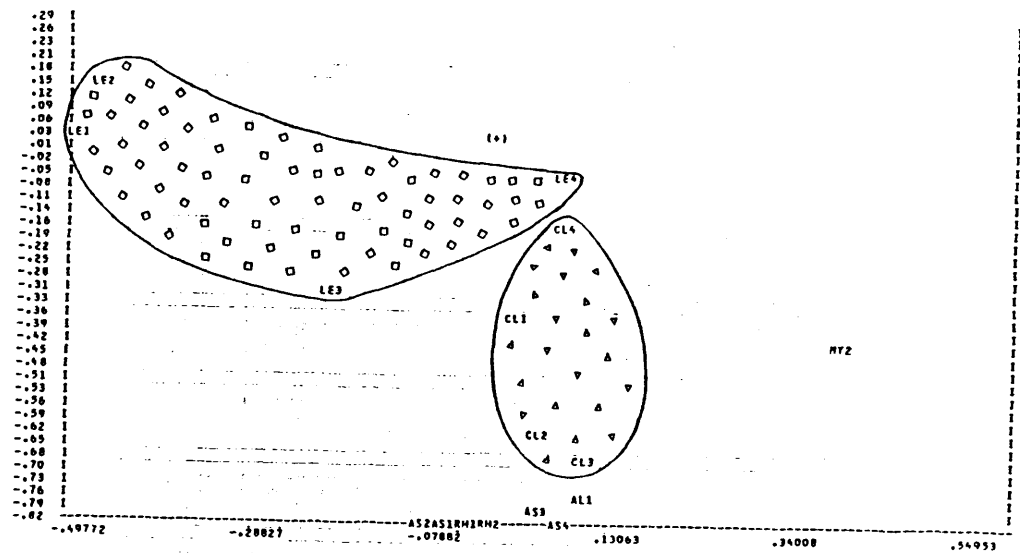
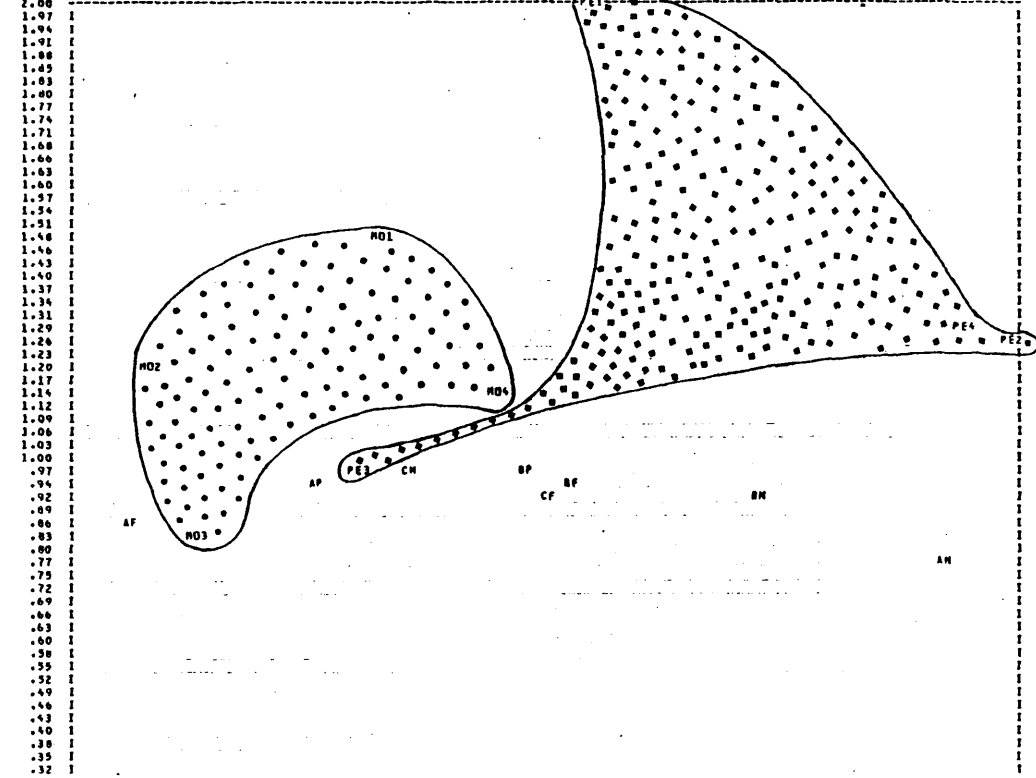
La aparición de una variable cerca de uno de los grupos significa que ésta contiene el mayor número de colonias del género encontrado.

En el segundo caso estudiado, aparecen igualmente 4 grupos, si bien no en el mismo orden ni en la misma posición, pero siendo su interpretación la misma.

294

0. -0. -0. 0. 0. 0. -0. 0. -0. 0. 1.
1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 2. 1.

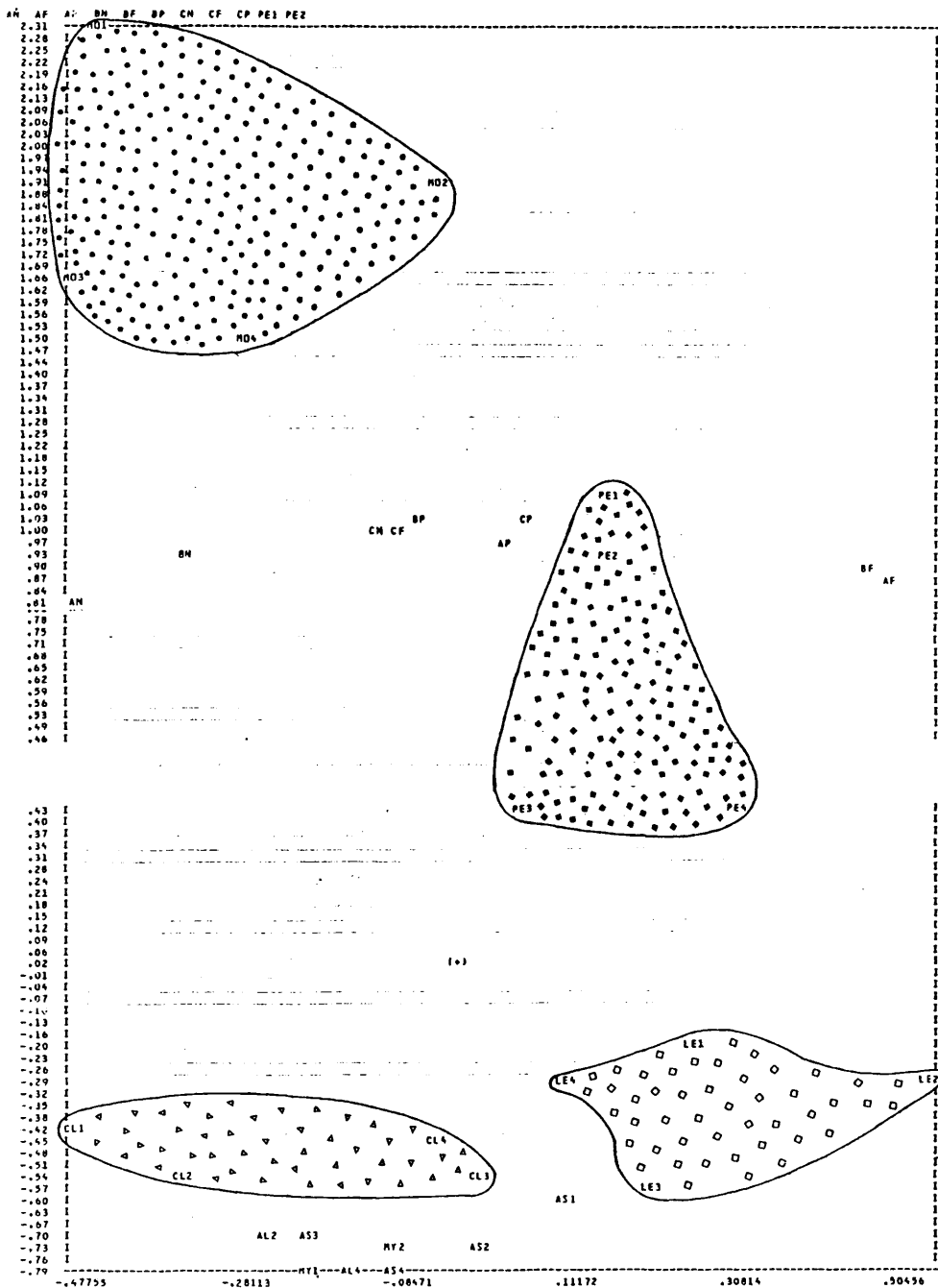
AN AP AH BF BP CN CF CP PE1 PE2



PUNTOS MULTIPLES= (AL4,MT4)E

295

-0. 0. 0. -0. 0. -0. -0. -0. 0. 0. 0.
1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1.



V.3. ESTUDIO AFLATOXICOGENICO

V.3.1. Comprobación de cepas aflatoxicogénicas

Una vez aislada e identificada la micoflora del yogur, hallamos 12 cepas pertenecientes al género *Aspergillus parasiticus*.

Se hacía necesario comprobar si entre ellas había alguna cepa productora de algún tipo de las aflatoxinas ya citadas en el apartado I.4. Para este estudio empleamos el medio de cultivo, trigo machacado y humedecido, descrito en el apartado IV.3.5.1.

Los análisis correspondientes para su determinación se comenzaron a realizar a partir del sexto día de la siembra, detectándose la producción de aflatoxinas al decimotercer día.

De las 12 cepas estudiadas, 5 fueron productoras de aflatoxinas B₁ y G₁.

Por las pruebas de determinación Cuantitativa valoramos que la producción de aflatoxina B₁ era 391 µg/kg y la G₁ era 979 µg/Kg.

V.3.2. Inoculación en el yogur de cepas aisladas y de colección productoras de aflatoxinas

Las cepas aisladas en nuestro estudio que en un medio ideal de crecimiento como el trigo machacado y humedecido habían sido productoras de aflatoxinas, fueron inoculadas en el yogur al igual que una cepa tipificada de colección *A. parasiticus* NRRL 2999 y dos *A. flavus* NRRL 3251 y NRRL 3357, para ver si en el sustrato - por nosotros estudiado, eran capaces de producir aflatoxinas, bien en las mismas cantidades, o en otras diferentes, con el fin de poder establecer comparaciones.

Los yogures fueron inoculados con una cantidad aproximada de 5.800 esporas/mm³ de cada una de las cepas a estudiar y en cada tipo de sabor ya mencionado.

Su incubación se realizó a la temperatura de 22º C en estufas de cultivo, procediéndose a los correspondientes análisis de determinación cuantitativa, a partir del segundo día y con intervalos de 48 horas, hasta dos días después de la fecha de caducidad.

Aunque el crecimiento de las diversas estirpes en los distintos yogures fue notable, invadiendo gran parte de la masa del yogur, en ningún caso hubo producción de aflatoxinas, tanto en las cepas por nosotros aisladas como en las cepas procedentes de colección.

VI. DISCUSIÓN

VI.1. DISCUSION DEL ESTUDIO DE LA MICROFLORA DEL YOGUR

VI.1.1. Medios de cultivo

Se hizo un ensayo experimental previo a esta investigación, con el fin de comprobar cuáles serían los medios mas idóneos para nuestro estudio.

Fueron utilizados Agar Extracto de Malta con oxitetraciclina; Agar Malta a pH 3,6 con ácido tartárico (Holwerda, citado por Hup, 1973); Patata dextrosa agar acidificado con ácido tartárico a pH 3,5 (Ingram, citado por Hup, 1973); Phyton extracto de levadura agar conteniendo streptomycin y cloramfenicol (Car michael y Kraussm citado por Hup, 1973); Agar glucosado según Sabouraud con oxitetraciclina; Agar Czapek-Dox con oxitetraciclina; Agar Czapek-Dox con adición de extracto de levadura y oxitetraciclina; Agar Maltosado según Sabouraud con oxitetraciclina; OGA, que es un medio que contiene extracto de levadura, glucosa, bilis y propionato sódico, conteniendo también rosa de bengala y oxitetraciclina como inhibidores de otros microorganismos; y Glucosa extracto de levadura con adición de oxitetraciclina (Mossel, citado por Hup, 1973).

Todos estos medios de cultivo fueron utilizados, como ya se dijo anteriormente, en un ensayo preliminar que se hizo sobre un total de 10 muestras. En cada una de las muestras realizadas fueron empleados todos los medios de cultivo por duplicado, con el fin de verificar la homogeneidad en los resultados y así poder determinar cuál de los medios era el mas adecuado para el estudio concreto que nos ocupa.

De esta manera fueron seleccionados: Agar Extracto de Malta, Agar Glucosado según Sabouraud, Agar Czapek-Dox y Agar Czapek-Dox con extracto de levadura. A todos ellos se les adicionó oxitetraciclina.

El Agar Malta fue seleccionado por ser un medio muy rico, en el que esporulan y se desarrollan abundantemente la mayoría de los mohos.

El Agar Glucosado según Sabouraud, es un medio de cultivo muy conocido y recomendado sobre todo para el estudio de los hongos patógenos. Si bien es cierto que en nuestro ensayo no ha aparecido ninguno descrito como tal, pensamos que no sería recomendable eliminar esta posibilidad, puesto que de aparecer en alguna muestra, daría mayor interés a nuestro trabajo.

Aunque el Agar Czapek-Dox es un medio recomendado para el aislamiento e identificación de los distintos géneros, fue utilizado por no producir una gran esporulación. Condición ésta que nos venía a resolver el problema de algunos géneros, ya que al poseer éstos un crecimiento muy rápido y abundante, con cualquier otro medio cubrían por completo la superficie de la placa, impidiendo el crecimiento de otros mohos y, como es lógico, su posterior identificación.

También podíamos haber seleccionado el OGA, pues cumple esta misión perfectamente, pero al llevar el rosa de bengala, la inhibición es mucho mas fuerte, incapacitando el crecimiento de algunos hongos encuadrados en géneros comprendidos en la llamada micoflora normal del yogur.

Por último, seleccionamos Agar Czapek-Dox con extracto de levadura, por ser éste un medio exactamente igual al anterior, pero enriquecido, con lo cual nos favorecía el crecimiento de especies que no pudiesen desarrollarse en el medio de Czapek y nos permitía establecer una comparación mas exacta de resultados.

IV.1.2. Recuento de colonias

Al proceder a discutir este aspecto y comparar nuestros resultados con los de otros autores, se toca con el inconveniente de la escasa documentación que existe sobre trabajos referentes a la micoflora contaminante del yogur y que en las contadas ocasiones en que se han hallado referencias el problema era tratado siempre desde un punto de vista cuantitativo y no cualitativo.

Como ya se dijo en el apartado anterior, se realizó un ensayo previo de 10 muestras por duplicado, para ver si era viable nuestra futura investigación. Desde la primera muestra empezamos a realizar el recuento de colonias.

El método utilizado para ello fue el de diluciones decimales, que había sido empleado por Rodríguez Ferri (1978), Koburger (1970), Martínez Pardo (1978) y recomendado por el Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, puesto que otros autores, como Davis (1975), Osborne (1974) y Tilbury (1974), realizan contajes de colonias en yogur, pero no especifican el método empleado.

En este ensayo previo, citado anteriormente, ya se vio que no se podía efectuar un contaje de hongos de la misma manera que se realiza un recuento de bacterias o, en otras palabras, el significado es diferente. Pero aún así decidimos efectuar, en todo nuestro trabajo, este tipo de estudio, a fin de comparar los resultados obtenidos con los de otros autores.

Como ya se ha citado en apartados anteriores, se realizó una toma directa del yogur y dos diluciones, es decir, la dilución 10^{-1} y la 10^{-2} .

De los resultados obtenidos por su variabilidad y difícil

reproductividad, se deduce el escaso valor de un recuento de colonias por cc en el yogur previa dilución, puesto que se observó (figuras del apartado V.2.2.) que normalmente las poblaciones distribuidas por diluciones por separado, eran valores muy semejantes, independientemente de la dilución, no presentando apenas variación y observándose que, al representarlas gráficamente mediante polígonos de frecuencias, todas ellas daban unas curvas bimodales.

Siendo esto así, decidimos en las primeras fases de nuestro estudio, realizar el análisis a partir de la toma directa.

El elegir este método no se debió a otra causa que el pensar que, al ser la primera que se realizaba, nos podría evitar una posible fuente de contaminación y nos simplificaría el trabajo.

Todos estos resultados cuantitativos, en desacuerdo con los reseñados por los autores citados anteriormente, tienen para nosotros una explicación que es preciso discutir.

Esta explicación la hallamos al estudiar las características morfológicas y de reproducción de los hongos, citadas en el apartado I.4.

Mientras que las bacterias tienen su reproducción por fisión binaria, nos encontramos que los mohos tienen un sistema de reproducción mucho mas amplio. Así una colonia puede formarse a partir de una espora, de otra colonia, de una fragmentación de hifas, etc.

De esta manera, van a intervenir una serie de factores, como por ejemplo la agitación, que en el caso de las bacterias nunca desempeñarían un papel fundamental y, sin embargo, en nuestro caso, van a jugar un papel decisivo a la hora de hacer

un recuento.

Pensamos que todo ésto es suficiente para hacernos ver que el recuento de colonias en mohos es desestimable, al menos en el yogur, en donde no cabe esperar un potente y eficaz desarrollo de las hifas que impida su facil fragmentación.

VI.1.3. Micoflora del yogur

En el estudio realizado sobre la micoflora presente en el - yogur, nos encontramos, en primer lugar, con el inconveniente de la total ausencia de trabajos en este tema, puesto que los estudios realizados sobre la micoflora del yogur por otros autores, como ya se inició en el apartado VI.1.2. se refieren a aspectos cuantitativos. Esto nos llevó a considerar el interés de una aportación al conocimiento cualitativo de la micoflora del yogur.

En nuestro trabajo podemos dividir la micoflora aislada en dos grupos. Uno de ellos es el formado por lo que nosotros denominamos micoflora esporádica, ya que tiene una frecuencia de aparición muy pequeña y otro grupo que denominamos micoflora normal del yogur, por tener la mayor frecuencia de aparición.

Es a este último grupo al que vamos a dedicar nuestra atención.

Los géneros pertenecientes a este grupo son: *Penicillium*, *Monilia*, *Cladosporium*, *Micelia sterilia*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Levaduras*.

Si observamos los resultados obtenidos en tantos por ciento y expresados en las tablas del apartado V.2.1., según los distintos medios de cultivo, podemos ver cómo la frecuencia de aparición de los distintos géneros es diferente según estudiemos la -

situación inicial o final. Así en la situación inicial observamos que los géneros mas frecuentes son *Penicillium*, *Monilia*, levaduras y *Cladosporium*, éstos siempre en el mismo orden, el resto de los géneros mencionados que ya poseen una frecuencia menor, pueden variar ligeramente su orden de aparición, dependiendo de los medios de cultivo. Pero con estos cuatro géneros citados, el orden es el mismo en cualquiera de los medios de los cultivos.

Mientras que en la situación final el orden de aparición es *Monilia*, *Penicillium*, levaduras y *Cladosporium*, variando el resto de los géneros como en la primera situación.

Observamos, pues, a la vista de estos resultados, que la diferencia mas significativa se produce entre la frecuencia de aparición de *Penicillium* y *Monilia*.

Estos resultados, que fueron realizados mediante tablas de porcentajes, fueron confirmados mediante el análisis de componentes principales, ya que, como se vio en el apartado V.2.6., las representaciones gráficas de los distintos géneros nos sitúa al género *Penicillium* como el mas frecuente en la situación inicial, mientras que en la situación final es el género *Monilia* el mas frecuente.

El inconveniente que supone para nosotros la ausencia de bibliografía, hace que no podamos comparar nuestros resultados con los de otros autores, por lo cual decidimos ver si la micoflora aislada en nuestro estudio podía estar relacionada principalmente con la micoflora aislada del aire y podría influir ésta en la identificada por nosotros.

A tal fin, se consultaron los trabajos de Calvo Torrás -- (1978) sobre el aire de Barcelona y los de Paya Vicens (1981) en Madrid, comprobando que, efectivamente, los hongos aislados

por nosotros estaban dentro de la micoflora que aislaron con mayor frecuencia de aparición dichos autores.

VI.2. TRATAMIENTO DE DATOS

Todos los datos obtenidos en nuestro estudio vienen dados en porcentajes, por ser éste el método mas común de tratar distintos resultados y ser recomendados por distintos autores como Sokal (1969), Murray (1975), Freund (1972). Así mismo, para poder representarlos gráficamente, se ha utilizado el polígono de frecuencias, por considerar que sería como mejor observaríamos la distribución de las distintas poblaciones, ya fuese bien por marcas y sabores, bien por diluciones o por medios.

Posteriormente, se pensó en aplicar algún tratamiento estadístico, como podían ser medias, varianzas, medianas, etc-

Métodos muy comunes pero que, sin embargo, en nuestro caso no fue posible utilizar, puesto que topábamos con el inconveniente de que todos los resultados así obtenidos serían falsos. Esto era una consecuencia del recuento de colonias y las características de reproducción de los mohos, puesto que no podía haber medias cuando en una muestra teníamos un número incontable de mohos y, en otra, ausencia total de ellos. De haberlo realizado así, esa media no nos daría un reflejo real de la población y, por tanto, tampoco los otros tratamientos estadísticos que pudiésemos aplicar.

Sin embargo, sí pudimos utilizar la prueba del chi-cuadrado. Esta prueba nos permitió observar si había diferencias significativas entre los yogures del mismo lote recién elaborados y los que eran analizados el día de su caducidad, en relación a la micoflora presente en ellos, según las marcas, sabores y medios de cultivo.

Otro método empleado ha sido el estudio de componentes principales mediante ordenador.

Este estudio, que es un poco como una recopilación de todas las tablas de porcentajes y sus respectivos polígonos de frecuencias, pretende representarnos en el espacio las poblaciones de los géneros que han tenido una mayor frecuencia de aparición y en qué marca y sabor han tenido su mayor influencia.

De esta manera se observan los cuatro géneros mas frecuentes, tanto en la situación inicial como final, en un primer golpe de vista, puesto que cuanto mayor sea la frecuencia de un determinado género mas arriba aparecerá situado en el plano, descendiendo de posición a medida que la frecuencia de aparición va siendo menor.

Esto realizado, como ya hemos dicho, para las dos situaciones, nos permite observar cómo un género que aparece con una frecuencia muy alta en la situación inicial, no lo es tanto en la final, o viceversa.

VI.3. DISCUSION DEL ESTUDIO AFLATOXIGENICO

VI.3.1. Estudio de cepas aflatoxigénicas

Se hizo un estudio de las distintas cepas aisladas en el yogur de *Aspergillus parasiticus*, por considerar que podían ser algunas de éstas posibles productoras de aflatoxinas.

Para probar su capacidad toxicogénica, las distintas cepas fueron sembradas en un medio idóneo. El medio seleccionado por nosotros fue trigo machacado y humedecido. La razón de escoger este medio fue la de al estar el trigo machacado, había una gran superficie de aireación y, a la vez, al estar humedecido, había el suficiente grado de humedad para que cualquier cepa pudiese desarrollarse en unas condiciones óptimas en cuanto a potencial de oxidorreducción (R_h) y actividad de agua (a_w).

Lógicamente empezamos a practicar los correspondientes análisis en el momento en que el crecimiento era abundante por toda la placa.

El método seguido fue el recomendado por Gimeno Ciriano (1979) para cereales. El haber seleccionado dicha técnica ha sido debido a que fue elegido como método oficial para extracción de aflatoxinas en 1981.

Como ya se dijo, la primera extracción se realizó en el momento en que el crecimiento era abundante, y el peso del micelio podía considerarse suficiente para que pudiera haber algunas trazas de aflatoxinas. Sin embargo, como ya mencionamos en el apartado V.3.1., los resultados fueron negativos, no encontrando producción de aflatoxinas hasta el decimotercer día de su siembra y no en todas las cepas estudiadas, ya que de las doce cepas aisladas, sólo cinco nos dieron positivas.

Posteriormente, se procedió a la determinación cuantitativa, también según el método de Gimeno Ciriano (1979), para ver las cantidades producidas por nuestras cepas.

VI.3.2. Inoculación de cepas aflatoxicogénicas en el yogur

El siguiente paso en nuestro estudio fue comprobar si las cepas anteriormente estudiadas, y otras de colección citadas en el apartado V.3.2., eran capaces de producir aflatoxinas en el yogur.

Para eso, lo primero que debíamos hacer era encontrar la técnica adecuada, para en el caso de que hubiera producción de aflatoxinas en el yogur, nosotros pudiéramos detectarlo.

Fueron utilizadas las técnicas de Van Egmond (1981), Purchasse (1967), Goded (1975), Kiermeier (1976), Shih (1971) y Schuller (1973).

Para determinar cual era la técnica que a nosotros nos convenía, procedimos a inocular una cantidad determinada de aflatoxina pura en el yogur y proceder a continuación a realizar la extracción, según las distintas técnicas.

La técnica que nos dio resultados positivos fue la utilizada por Schuller (1973).

A continuación procedimos a hacer la revisión bibliográfica correspondiente. Solamente encontramos una referencia que tuviera relación con nuestro estudio: fue el realizado por Polzhofer (1977).

Decimos que tuviera relación porque, en realidad, lo que este autor hizo fue un análisis directo del yogur, para ver si encontraba algún tipo de aflatoxina. La aflatoxina encontrada por él fue la M_1 .

Mientras que en nuestro estudio lo que nos propusimos fue determinar si las cepas aflatoxicogénicas eran capaces de producir aflatoxinas en el yogur.

Para tal fin, inoculamos las cepas ya mencionadas en los distintos sabores de yogur. Los resultados, como ya se mencionan en el apartado V.3.2., fueron negativos, pese a que el crecimiento del moho en el yogur fue muy abundante.

Como quiera que el pH del yogur podría permitir perfectamente la formación de este tipo de sustancias tóxicas, la ausencia de aflatoxinas tiene que deberse o a una acción directa del ácido láctico, o a un mecanismo competitivo con *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*.

La determinación de esta cualidad, por las evidentes implicaciones que comporta, está siendo objeto de un estudio independiente y muy minucioso en nuestro laboratorio.

VII. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos enunciar las siguientes conclusiones:

1. El estudio cualitativo sobre la micoflora contaminante del yogur , nos divide ésta en dos tipos: a) el formado por los hongos que representan la flora normal o habitual; b) el que constituye la flora esporádica o poco frecuente.
2. Los hongos que pertenecen a la micoflora normal son: *Penicillium*, *Monilia*, *Cladosporium*, *Micelia sterilia*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Aspergillus* y levaduras en general.
3. Los hongos que pertenecen a la micoflora esporádica o poco frecuente son: *Circinella*, *Mycothypha*, *Cunninghamella*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Aphanocladium*, *Paecilomyces*, *Monodictys*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, - *Stemphylium*, *Curvularia*, *Ulocladium* y *Veronaea*.
4. Del estudio micológico de las distintas marcas del yogur, se deduce que, en todas ellas, los hongos que forman la llamada micoflora normal son los mismos, aunque presenten pequeñas diferencias en los porcentajes de aparición, debido probablemente a la distinta composición de cada uno de los sabores estudiados e incidencias diversas de los procesos de transformación y conservación.
5. Del estudio de las frecuencias de aparición de cada uno de los géneros en las distintas tomas y en los cuatro medios de cultivo para la situación inicial, se deduce que ha sido el género *Penicillium* el que ha alcanzado los mayores porcentajes.
6. En el mismo estudio realizado para la situación final se -

observó que fue el género *Monilia* el que obtuvo una mayor frecuencia de aparición, lo que indica una evolución de la micoflora durante el período de almacenaje, siendo éste un hecho importante.

7. De los resultados obtenidos sobre el recuento de unidades formadoras de colonias, se desprende que dicho procedimiento no debe ser utilizado para este tipo de flora y productos.
8. Desvalorizado el estudio cuantitativo de hongos en el yogur y al carecer de un significado específico, sobre un especial interés el estudio de las frecuencias de aparición que han alcanzado cada uno de los géneros aislados.
9. De los resultados obtenidos en la comprobación del medio - mas idóneo en nuestro estudio, se deduce que todos ellos presentan el mismo nivel de eficacia.
10. Del estudio de la contaminación por marcas y sabores en la situación inicial se observa el mismo nivel de contaminación en general en las tres marcas, teniendo que destacar una mayor contaminación en la marca B, sabor plátano, lo - que estadísticamente queda asegurado.
11. Del estudio de la contaminación por marcas y sabores en la situación final se desprende que tanto la marca A como la C presentan una contaminación similar, siendo la marca B, en todos sus sabores, la mas contaminada, lo que pone de manifiesto la influencia del proceso tecnológico en la contaminación del yogur.
12. Del estudio por géneros se deduce que, para el género *Penicillium*, tanto en la situación inicial como final, es en la marca B donde ha habido una mayor frecuencia de aparición.

Para el género *Cladosporium*, la contaminación es similar en todas las marcas para ambas situaciones.

Para el género *Monília*, tanto para la situación inicial como final, sigue siendo la marca B la mas contaminada y, dentro de ella, el sabor plátano.

Y con respecto a las levaduras podemos decir que su distribución en cada una de las marcas y sabores es arbitraria.

13. Del estudio de la micoflora se aislaron 5 cepas aflatoxicogénicas pertenecientes a la especie *Aspergillus parasiticus* habiendo producido todas las estirpes aflatoxinas B₁ y G₁, en un medio de inducción óptimo, como es el trigo humedecido y machacado.
14. La inoculación de cepas aflatoxigénicas en el yogur no ha dado origen a la producción de aflatoxinas en el mismo, a pesar de la masiva proliferación de las estirpes de *A. flavus* y *A. parasiticus* utilizadas.
15. Evidentemente, y puesto que el pH del yogur cae dentro de los valores relativos en los que es posible la formación de estos derivados cumarínicos, la ausencia de aflatoxinas en el yogur tiene que deberse a una acción directa del ácido láctico formado o a un mecanismo competitivo de la micoflora del yogur (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*).

Esta cuestión, cuyas implicaciones no es preciso comentar, está siendo estudiada intensamente en nuestro laboratorio.

VIII. RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre la micoflora contaminante del yogur.

El muestreo fue realizado sobre un total de 473 muestras, pertenecientes a tres marcas distintas, en las cuales se estudiaron distintos tipos de sabores, así como el grado de contaminación durante las distintas fases de almacenaje.

Los métodos utilizados en nuestro estudio fueron:

- . Las técnicas usuales para el aislamiento e identificación de la micoflora presente, así como las diluciones decimales para el recuento de colonias.
- . Método de extracción de aflatoxinas para cereales, según la técnica de Gimeno Ciriano.
- . Método de extracción de aflatoxinas para productos lácteos según la técnica de Schuller.

El estudio realizado sobre el tipo de micoflora presente en el yogur nos indicó que existen lo que podríamos clasificar en dos grupos: a) flora esporádica o poco frecuente y b) flora normal cuya frecuencia de aparición es mas elevada. Esta última está constituida por *Penicillium*, *Monilia*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Micelia sterilia*, *Rhizopus*, *Aspergillus* y levaduras en general.

Los resultados obtenidos en el recuento de colonias nos hicieron llegar a la conclusión de que dicho procedimiento era desestimable debido a las características morfológicas y de reproducción de los hongos.

En el estudio aflatoxigénico fueron empleados los dos métodos ya citados anteriormente, ya que en primer lugar se realizó un estudio sobre las posibles cepas aflatoxigénicas aisladas del yogur, en el cual hallamos que eran 5 las cepas productoras de aflatoxinas; y un segundo estudio, en el cual inoculamos en el yogur dichas cepas y otras de colección, para ver si en dicho sustrato podían producir dichos metabolitos. Este estudio nos dio resultados negativos.

SUMMARY

In this project a study has been made on the micoflora - which contaminate yoghurt.

The sampling was taken from a total of 473 specimens belonging to different brands in which both the different types of flavours and the degree of contamination during the different stages of storage were studied.

The methods used in our studies were:

- * The usual techniques to isolate and identify the micoflora present and also the decimal dilutions for counting the colonies.
- * The Aflatoxine Extraction method for cereals according to Gimeno Ciriano's technique.
- * The Aflatoxine Extraction method for dairy products according to Schuller's technique.

The study of the type of micoflora found in yoghurt showed us that there exist what we can classify into 2 groups: a) sporadic or very infrequent flora, b) normal flora the appearance of which is more frequent. The latter consists of *Penicillium*, *Monilia*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Micelia sterilia*, *Rhizopus*, *Aspergillus* and yeasts in general.

From the results obtained in the colony-count we concluded that such a process was to be rejected due to morphological characteristics and the reproduction of the fungus.

The 2 aforementioned methods were used in the aflatoxigenic study as, at first, we made a study of the possible isolated.

- 315 -

aflatoxigenic growths of aflatoxins. Secondly we made a study in which we innoculated these growths and others from the collection in yoghurt to see if in this substratum these metabolites could be produced. The results of this study were negative.

RESUME

Dans le présent travail nous avons réalisé une étude sur la mycoflore contaminante du yoghourt-

L'échantillonnage a été effectué sur un total de 473 - échantillons appartenant à trois marques différentes, dans les quelles nous avons étudié de diverses variétés de goûts et le degré de contamination pendant les différentes périodes de stockage.

Les méthodes utilisées dans notre étude ont été les suivantes:

- . Les techniques usuelles pour l'isolement et l'identification de la mycoflore présente, ainsi que les dilutions décimales pour la numération de colonies.
- . Méthode d'extraction d'aflatoxines pour des céréales selon la technique de Gimeno Ciriano.
- . Méthode d'extraction d'aflatoxines pour des produits lactés selon la technique de Schuller.

L'étude réalisée sur la variété de mycoflore présente - dans le yoghourt nous a indiqué qu'il existe ce que nous pouvons classer en deux groupes: a) flore sporadique ou peu fréquente et b) flore normale dont la fréquence d'apparition est plus élevée. Celle-ci est constituée par *Penicillium*, *Monilia*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Micelia sterilia*, *Rhizopus*, *Aspergillus* et par des levures en général.

Les résultats obtenus dans la numération de colonies nous ont fait arriver à la conclusion de que le procédé était mésestimé dû aux caractéristiques morphologiques et de reproduction

moisissures.

Les deux méthodes dites précédemment ont été employées dans l'étude aflatoxigenique puisque premierement nous avons réalisé une étude sur les possibles souches aflatoxigeniques isolées du yoghourt et nous avons trouvé que c'étaient 5 les souches productrices d'aflatoxines, et ensuite une deuxième étude dans laquelle nous avons inoculé dans le yoghourt ces souches-ci et d'autres souches de collection pour vérifier si dans ce substrat elles pouvaient produire ces métabolites.

Cette étude nous a donné des résultats négatifs.

IX, REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

AINSWORTH G.C. and SUSSMAN A.S.- Vol I. The fungal cell; Vol II. The fungal organism; Vol III. The fungal population; Vol IV a. A taxonomic review with keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti ; Vol IV b. Basidiomycetes and lower fungi. Academic Press, New London. 1965-1975

ALEXOPOULOS C.J.- Introducción a la Micología. Editorial Universitaria de Buenos Aires, pág. 615. 2ª edición. 1976

ANON.- Dirección General de Sanidad. Aditivos para el yogur. Revista Española de lechería, 101: 198-199. 1976

BARNETT H.L. and HUNTER B.B.- Illustrated genera of Imperfecti Fungi. Burgess Publishing Company. 3ª edición. pág. 241. 1972

BARRONS G.L.- Of Hyphomycetes from soil. Robert E. Krieger Publishing Company. pág. 360. 1977

BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO núm. 88. Código Alimentario Español. Dto 705/1976. Orden de 5 de Marzo

BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO núms. 248 a 253. Orden del 17 al 23 de Octubre de 1967

BOOTH C.- The genus Fusarium. C.M.I. Kew. pág. 237. 1971

CAIN ROY F.- Evolution of the Fungi. Mycologia 64:1-14. 1972

CALVO TORRAS M.A. - Tesis doctoral. Contribución al estudio de la micoflora atmosférica de la ciudad de Barcelona. 1978

CHAMBERS J.V.- Culture and processing techniques important to the manufare of good quality yoghourt. Cultures Dairy products

journal 14 (2): 28-29. 1972

CIDONCHA F.S.- Aflatoxins. Revista Alimentaria 8:3-6. 1971

COOKE Wm.B.- Terminology of the Fungi Imperfecti. Mycophth. Mycol. Appl. 53: 45-67. 1974

DAVIS J.C. and MCLACHLAN T.- Yogur in the United Kingdom: chemical and microbiological analysis. Dairy Industries 39 (5): 149-157. 1974. Dairy Sciences Abstracts III. 1389: 37-3. 1975

DOMSCH K.H. and GAMS W.- Fungi in agricultural soils. Lonman Group limited. pág. 287. 1972

DUBOIS G., DESAULNIERS-THERRIEN F., CHARBONNE Av.R.- Yeast contamination in stirred yogur. Lait 60 (597): 393-396. 1980

ELLIS M.B.- More Dematiaceus Hyphomycetes. C.M.I. Kew. pag: 508. 1976

FREUND J.E. and WILLIAMS F.J.- Elementos modernos de estadística empresarial. Editorial Prentice/Hall. International. pág. 461. 1972.

GIMENO CIRIANO A.- Técnica analítica para la determinación de las micotoxinas. Piensos compuestos Rossel S.A. pág. 28. 1979

GODED and MURA.- Aflstoxins in milk and milk products. Revista Española de Lechería 98: 231-235. 1975

GUARRO ARTIGAS J. y CALVO TORRAS M.A.- Aportación al conocimiento de los Hyphomycetes de España: 1. G. Aspergillus. Anales del Inst. Botánico Antonio José Cavanillas del C.S.I.C. 24 (2): 417-437. 1977

HEATHCOTE J.G. and HIBBERT J.R.- Developments in food science 1 aflatoxins: chemical and biological aspects. Elsevier scientific publishing company. pag: 212. 1978

HESSELTINE C.W.- General of Mucorales with notes on their synonymy. Micologia 47: 345-363- 1955 a

HESSELTINE C.W. and FENNEL D.I.- The genus Circinella. Micologia 47: 193-212. 1955 b

HOLZAPFEL C.W. STEYN P.S., PURCHASE I.F.H.- Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂. Tetrahedron letters 25: 2799-2803. 1966

HUGHES S.J.- Conidiophores, Conidia and classification. Canadian Journal of Botany. 577-659. 1953

HUP G.- Comparison of media for the enumeration of yeast and moulds in dairy products. Netherlands milk and dairy journal 26 (3): 131-140. 1973

INUI T., TAKEDA Y., IIZUKA H.- Taxonomical studies on genus Rhizopus. The journal of general and applied microbiology 11: 1-108. 1965

JARVIS B.- Comparison of an improved rose-bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeast in foods. Journal of applied Bacteriology 36 (4): 723-727. 1973

JAY J.M.- Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia. Pág. 491. 1978

JEMMALI M.- Les mycotoxines dans l'alimentation. III Symposium international IUPAC sur les mycotoxines dans l'alimentation. Edition C.N.R.S. pag: 1029. 1976

JOLI P.- Le genre *Alternaria*. Ed. P. Lechevalier. pag: 247.1964

JONES B.D.- Methods of afltoxin analysus. Tropical products institute. 1972

KIERMEIER F.- The significance of aflatoxins in the dairy industry. Annual Bulletin, International Dairy Federation 98. 1977

KIERMEIER F., WEISS G.- Investigation of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ and M₁ in milk and milk products. Zeitschrift für Lefeusmittel-Untersuchung und-Forschung 160 (4): 337-344. 1976

KOBURGER J.A.- Fungi in foods. I. Effect of inhibitor and incubation temperature on enumeration. J. Milk Food Technol. 33: 433-434. 1970

KOBURGER J.A. and NORDEN A.R.- Fungi in foods. VII A comparison if the surface, pour plate and most PNM for enumeration of yeast and moulds. Journal of milk and food technology 38 (12):742-746. 1975

KOSIKOWSKI F.- Cheese and fermented milk foods. pag: 429. 1970

KROGER M.- Quality of yogur. Journal of Dairy Science. 59 (2): 344-350. 1976

LEBART L., FENELON J.R.- Statistique et inframatique apliquee. ED. Dunod. Paris. 1973

LODDER J.- The yeast. A taxonomic study. North-Holland Publishing Company. 3a edition. pag: 1385. 1974

MADID VICENTE A.- Aspectos importantes de la producción industrial y control de calidad en el yogur. Alimentaria 9 (46): 5-9. 1972

MARTINEZ PARDO G.- Estudio comparativo de la calidad en yogures de fabricación nacional. Alimentaria 97: 55-56, 58-62. 1978

MASSI M.S., PAGE J.R., GARCIA V.C.- Analysis for aflatoxin M in milk. J.A.O.A.C. 51: 594-600. 1968

McGINNIS M.R.- Recent taxonomic developments and changes in medical mycology. Ann. Rev. Microbiol. 34: 109-135. 1980

MOLINA CANO J.L.- Introducción a la taxonomía numérica. Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. 1977

MOREAU M. Moissures toxiques dans l'alimentation. Masson et Cie. editeurs. 10a edición. pag: 453. 1974

MURRAY R. SPIEGEL.- Estadística. Teoría y 875 problemas resueltos. Libros McGraw-hill. 1975

OSBORNE R.J.W., PRITCHARD E.W.- Preservation of fruit yogur by preservatives and storage at low temperatures. XIX International Dairy Congress. 1E: 809-810. 1974

PAYA VICENS M.J.- Tesis doctoral. Contribución al estudio de la micoflora atmosférica de la ciudad de Madrid. 1981

POLZHOFFER K.- Determination of aflatoxins in milk and milk products. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung 163 (3): 175-177. 1977

PURCHASE I.F.H., STEYN M.- Extraction and estimation of aflatoxin M in milk. J.A.O.A.C. 50: 363-366. 1967

PURCHASE I.F.H., VORSTER L.J.- Aflatoxin in commercial milk samples. S.A.M.J. 42: 219. 1968

PURCHASE I.F.H.- Mycotoxins. Elsevier scientific publishing company. pag: 443. 1974

RAMIREZ C., MARTINEZ A.T., BERENGUER J.- Four new species of *Penicillium* isolated from the air. Laboratory of General and Applied Mycology. Inst. Jaime Ferran de Microbiologia. 1981

RAPER K.B., THOM CH.- A manual of the *Penicilia*. Williams and Wilkins Co. Baltimore pag: 875. 1949

RAPER K.B., FENNEL D.I.- The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Co. Baltimore, pag: 686. 1965

ROBERTSON J.A., PONS W.A. Jr.- Solid state fluorescence emission of aflatoxins and silica gel. J.A.O.A.C. 51 (6). 1968

ROBINSON R.K.- Dairy microbiology. Volume 2. The Microbiology of Milk Products. Applied Science Publishers. pag: 333. 1981

RODRICKS J.V.- Mycotoxins and other fungal related food problems. Advances in chemistry. Serie 149. American chemical society. pag: 409. 1976

RODRIGUEZ FERRI, F.- Contribución al conocimiento de la calidad higiénica del yogur. Alimentaria 91: 35-37, 39-42. 1978

SAMSON R.A.- *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*. Central bureau Voor Schimmel cultures Baarn. Institute of the royal Netherlands. Academy of Sciences and letters. pag: 119. 1974

SEITZ J.M.- Comparison of methods for aflatoxins analysis by high pressure liquid chromatography. Journal of Chromatography 104: 81-89. 1975

SHAKER M.E., MARTH E.H.- Growth of toxigenic and nontoxigenic

Aspergilli and Penicillia at different temperatures and in the presence of lactic acid bacteria. Department of food science and the food research. Institute University of Winsconsin. 1980

SHIH Ch., MARTH E.H.- Production of aflatoxin and its partition between the medium and the mycelium of *Aspergillus parasiticus* during incubation under various conditions. Z. Lebeusm. Unten-Forch. 158: 215-224. 1975

SCHULLER P.L., VERHULSDONK C.A.H., PAULSCH W.E.- Analyses of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk. Pure Appl. Chem. 35: 291-296. 1973

SHIH C.N., MARTH E.H.- A procedure for recovery of aflatoxins from cheese and other foods. J. Milk Food Technol. 34: 119-123. 1971

SIMMONS E.G.- Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Micologia* 59: 67-92. 1967

SMITH G.- Introducción a la micología industrial. Ed. Acribia. pag: 431. 1963

SOKAL R.R., ROHLF J.F.- Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones. 1969

SUTIC M., BANINA A.- The effect of aflatoxin B₁ on the morphological and biochemical properties of lactic acid bacteria for yogurt

STOLOFF L., STANLEY N., YIN L., RODRICKS J.V., STACK M., CAMPBELL A.D.- A mutimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and Patulin. J.A.O.C. 54: 91.97, 1971

STOLOFF L., HENRY S., FRANCIS O.J. Jr.- Survey for aflatoxins and Zearalenone in 1973. Crop corn stored on Farms and country elevators. J.A.O.A.C. 59: 118-121- 1976

STOLOFF L., FRANCIS O.J. Jr.- Survey for aflatoxins and zearalenone in Canned and frozen sweet corn. J.A.O.A.C. 63 (2): 180-181. 1980

STUBBLEFIELD R.D.- The rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products. Journal of the American oil Chemist's Society 56 (9): 800-802. 1979

STUTZ, KENT H., KWMPERMAN P.H.- Effect of temperature cycling on the production of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environmental microbiology 32 (3): 327-332. 1976

TAIJI INUI, YOSHITO TAKEDA, HIROSHI IIZUKA.- Taxomical studies on genus *Rhizopus*. The journal of general and applied microbiology. Vol 11. suplemento. pag: 108. Diciembre 1965

TANTAQUI ELARAQUI A.- Effect of the spore concentration of *Aspergillus flavus* on Aflatoxin B₁ production in food. Comptes Rendus des ceances de L'Academie d'Agriculture de France 64 (1) 69.77. 1978

TILBURY R.H.- Taxonomy of yeast in yoghourts and other dairy products. 4 Th international symposium on yeasts. Vienna, Austria, 8-12 Th July. 1974

TJTTSLER R.P., PEDERSON C.S., SNELL E.E., HENDLIN D., NIVEN Jr. C.F.- Symposium on the lactic acid bacteria. 227-260. 1952

VAN EGMOND H.- The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. Archives de l'Institute Pasteur de Tunis, 54 (3): 381-390. 1977

VAN EGMOND H.P.- Método rápido de análisis para la determinación semi-cuantitativa de la alfatoxina M₁ en la leche. Laboratory for chemical Analysis of Foodstuffs. National Institute of Public Health. 1981

VARABIOFF Y.- Spoilage and keeping quality of yoghourt. Dairy products 7 (2): 7-8. 1979

VEISSEYRE R.- Lactología técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. Ed. Acribia. pag:629.1980

VON ARX J.A.- The genera of fungi sporulating in pure culture. Ed. J. Cramer. 3ª edición. pag: 424. 1981

DE VRIES G.A.- Contribution to the knowledge of the genus Cladosporium Link ex Fr.Biblioteca micológica. Band 3. pag: 121. 1967

WILSON G.S., MILES A.A.- Principles of Bacteriology and Immunity. Vol 1. Edward Arnold Pub. 1975

YLLA-CATALA M.- Tesis doctoral. La formación de aflatoxinas en distintos tipos de féculas de calidad farmacéutica. 1978

ZYCHAN, SPIEPMANN R., LINNEMANN G.- Mucorales. J.Cramer Lehre Germany. pag: 353. 1969.

